

Wirtskontrollierte
Restriktions- und Modifikationssysteme
bei Rhizobiaceen

vorgelegt von
Klaus-Peter Winkler
aus Hohenberg/Eger

*Diss. Erlangen
1984*

1984 № 275



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Wirtskontrollierte Restriktions- und Modifikationssysteme bei Rhizobiaceen

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen - Nürnberg
zur
Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Klaus-Peter Winkler
aus Hohenberg/Eger

Als Dissertation genehmigt von den Naturwissenschaft-
lichen Fakultäten der Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 6.4.1984

Vorsitzender der Promotionskommission: Professor Dr. K. Jacobs

Erstberichterstatte: Professor Dr. W. Heumann

Zweitberichterstatte: Professor Dr. E. Schweizer

Meiner Frau, meiner Mutter und meinen Kindern

in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

A.	Zusammenfassung	1
B.	Einleitung	3
C.	Material und Methoden	6
I.	Biologisches Material	6
1.	Bakterienstämme	6
1.1.	Rhizobium- und Agrobacterium-Wildtypstämme	6
1.2.	Konvertantenstämme	7
1.3.	Sonstige Bakterienstämme	8
2.	Bakteriophagen	9
3.	DNA-Substrate	9
3.1.	DNA aus Viren	9
3.2.	Bakterielle Plasmid-DNA	10
3.3.	Bakterielle Gesamt-DNA	10
4.	Enzyme	10
II.	Chemikalien und Lösungen	11
1.	Nährmedien	11
1.1.	Flüssige Nährmedien	11
1.2.	Weichagar- und Festmedien	11
2.	Chemikalien	11
3.	Puffer und andere Lösungen	12
III.	Geräte und Hilfsmittel	14
IV.	Bakterienanzucht und Zellemtre	15
V.	Bakteriophagen-Techniken	15
1.	Weichagargußmethode	15
2.	Isolierung von Bakteriophagen	16
2.1.	Isolierung von Phagen aus dem Erdboden	16
2.2.	Phagenisolierung nach Vermehrung auf fremden Wirten	17
3.	Anreicherung der gereinigten Phagen	17
3.1.	Phagenanreicherung auf Platten	17
3.2.	Phagenanreicherung in Flüssigkultur	18
3.3.	Konzentrierung der Phagenlysate	19

4.	Methoden zur Untersuchung der Phagen-Wirtsspezifität	19
4.1.	Tropftests	19
4.2.	Quantitative Bestimmung der Phagenvermehrungsrate	20
5.	Präparation der Phagen-DNA	21
5.1.	Isolierung der Phagen-DNA	21
5.2.	Aufbereitung der Phagen-DNA	21
VI.	Nachweis, Reinigung und Charakterisierung von Restriktionsenzymen	22
1.	Schneller Nachweis von Restriktionsenzymen	22
2.	Reinigung von schnittspezifischen Restriktionsenzymen	22
2.1.	Präparation des enzymhaltigen Rohlysats	23
2.2.	Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung	23
2.3.	Trennung der Proteine über Phosphocellulose	23
2.4.	Trennung der Proteine über DEAE-Cellulose	24
2.5.	Konzentrierung der Enzymlösung	24
2.6.	Austesten der Enzymfraktionen	24
3.	Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	25
3.1.	Deproteinisierung von DNA	25
3.2.	Äthanol-fällung von DNA	25
3.3.	DNA- und Enzymkonzentration	25
3.4.	Reaktionsbedingungen	26
3.5.	Durchführung von Spaltungen	26
4.	Agarosegelelektrophorese	27
4.1.	Elektrophoresebedingungen	27
4.2.	Auswertung der Gele	27
D.	Ergebnisse	29
I.	Biochemischer Nachweis der wirtskontrollierten Modifikation und Restriktion	29
1.	Schneller Nachweis der Restriktionsenzyme	29
2.	Reinigung der Restriktionsenzyme	31
2.1.	Enzymreinigung unter TEMM-Puffer-Bedingungen	31
2.2.	Enzymreinigung unter PC-Puffer-Bedingungen	34
2.3.	Benennung der gereinigten Restriktionsenzyme	35
3.	Charakterisierung der gereinigten Restriktionsenzyme	35
3.1.	Bedingungen der Enzymreaktion	35
3.2.	DNA-Spezifität der gereinigten Restriktionsenzyme	37
3.3.	DNA-Modifikation der untersuchten Rhizobiaceen-Stämme	40

II.	Biologischer Nachweis der wirtskontrollierten Modifikation und Restriktion	45
1.	Isolierung wirtsspezifischer Bakteriophagen	45
2.	Qualitative Untersuchung der Phagen-Wirtsspezifität (Phagentypisierung)	47
2.1.	Einfache Phagentypisierungs-Versuche mit 10^5 Phagen	48
2.2.	Spezielle Phagentypisierungs-Versuche mit 10^{10} Phagen	51
3.	Quantitative Untersuchung der Phagen-Wirtsspezifität	56
3.1.	Phagenvermehrung innerhalb der eigenen Klasse	56
3.2.	Vermehrung auf Wirtsstämmen fremder Klassen	60
E.	Diskussion	66
1.	Verwandtschaft der untersuchten Bakterienstämmen	66
2.	Die Restriktions- und Modifikationssysteme der Rhizobiaceen: Allgemeine Übersicht	68
3.	Einzelbesprechung der verschiedenen Klassen	70
3.1.	Klasse I	70
3.2.	Klasse II	73
3.3.	Klasse III	75
3.4.	Klasse IV	75
4.	Betrachtungen zur Evolution der R/M-Systeme	78
5.	Ausblick	81
ANHANG I	Abbildungen zur Restriktionsanalyse in-vitro	83
ANHANG II	Literaturverzeichnis	96
ANHANG III	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	109

A. ZUSAMMENFASSUNG

Zum genaueren Verständnis der Beziehungen zwischen den einzelnen Klassen des von HEUMANN aufgestellten Genomstrukturierungs-Schemas der *Rhizobiaceae* (H9) wurden die Restriktions- und Modifikationssysteme (abgekürzt R/M-Systeme) der verschiedenen Klassen sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* analysiert. Stellvertretend für andere Teilsysteme wurde das *R. meliloti*-*A. tumefaciens*-System untersucht.

Die biochemische Charakterisierung der R/M-Systeme erfolgte durch Verdauung von bakterieller Gesamt-DNA aus den verschiedenen Klassen mit den aus repräsentativen Vertretern gereinigten Typ II-Restriktionsendonukleasen. Dabei konnten mit Hilfe eines neuen schnellen Nachweisverfahrens (W3) schnittspezifische Restriktionsenzyme in elf verschiedenen Stämmen demonstriert werden. Diese Enzyme wurden zum Teil präparativ gereinigt und näher charakterisiert. Eine der beiden Endonukleasen aus 18-1 (Klasse I) und die Restriktionsenzyme aus 31-4 (ebenfalls Klasse I), 20-1 (Klasse II), 33-1 und 29-1 (Klasse IV) sowie 8-51 (*R. leguminosarum*-Wildtyp) zeigten absolut unterschiedliche DNA-Spezifität bei Verdauung von λ -, pMB9- und einer Reihe anderer DNA-Species. Sie wurden gemäß den Nomenklaturvorschlägen von SMITH & NATHANS (S16) mit Atu-18 I, Atu-31 I (Min-Typ, Klasse I), Rne I, Rlu-1 I (Car-Typ γ , Klasse IV), Atu-29 I (Car-Typ γ , Klasse IV) und Rle I bezeichnet, wobei das Restriktionsenzym aus 31-4 (Atu-31 I) auch in dem Stamm 18-1 präsent war. Identische Endonukleasen wurden in den Stämmen 33-1, 1-624, 1-37, 1-56 und 1-99 (alle Rlu-1 I) nachgewiesen. Ein weiteres Restriktionsenzym aus 29-1, das zweifelsfrei die Aktivität von Atu-29 I beinhaltet, erhielt die Bezeichnung "Atu-29 II" (Car-Typ γ , Klasse IV)-Aktivität. Alle gereinigten Enzyme erwiesen sich als Bestandteil eines wirtskontrollierten und klassenspezifischen R/M-Systems des jeweiligen Bakterienstamms, da im Gegensatz zur DNA aus anderen Klassen weder die bakterieneigene noch die DNA aus Vertretern derselben Klasse oder zumindest Wirtsgruppe *in-vitro* gespalten wurde. Zum biologischen Nachweis der Restriktion und Modifikation wurde die Wirtsspezifität der für die Klassen I bis IV isolierten lytischen Bakteriophagen qualitativ (durch Phagentypisierung) und quantitativ analysiert. Die hierfür verwendeten Phagen wurden größtenteils 1980 von RÜSCH et al. für die Stämme 18-1 und 31-4 (Klasse I), 20-1 und 32-3 (Klasse II), 33-1, 1-37 und 29-1 (Klasse IV) gewonnen und mit ϕ 18, ϕ 31, ϕ 20, ϕ 32, ϕ 33, ϕ 1 und ϕ 29 bezeichnet. Mit ϕ 30 (aus 30-33) konnte ein weiterer wirtsspezifischer Phage für die Klasse III isoliert und eingesetzt werden. Alle verwendeten Phagen erwiesen sich sowohl als wirts- wie auch klassenspezifisch und nachweislich voneinander morphologisch und

genetisch verschieden. Die für einen Vertreter einer Klasse spezifischen Phagen ließen sich außer auf Wirten der eigenen auch auf einer ganzen Reihe von Wirten aus anderen Klassen vermehren, nicht jedoch auf systematisch nicht zugehörigen Gattungen. Dies unterstreicht die verwandtschaftliche Zusammengehörigkeit der untersuchten Stämme innerhalb des Systems der *Rhizobiaceen*. Darüberhinaus ergab sich eine signifikante Verminderung der Überlebensrate auf Wirten aus anderen Klassen, während in der Regel die Vertreter der eigenen Klasse oder Wirtsgruppe mit gleicher Effektivität lysiert wurden. Durch Isolierung und Rücktesten der auf anderen Klassen vermehrten Phagen auf dem ursprünglichen Wirt konnte in allen Fällen Restriktion der Phagen-DNA nachgewiesen werden. Die neugewonnenen Phagen vermehrten sich nun ihrerseits mit hoher Effektivität auf dem neuen Wirt, während der Originalwirt erheblich seltener lysiert wurde.

Die vorliegende Arbeit demonstriert das Vorliegen wirtskontrollierter P/M-Systeme in den Klassen I bis IV des Schemas der Genomstrukturierung der *Rhizobiaceen*. Diese P/M-Systeme sind klassenspezifisch. Innerhalb der Klasse I wurde die Expression eines zweiten, höchstwahrscheinlich vom Ti-Plasmid codierten P/M-Systems in *A. tumefaciens*-Stämmen nachgewiesen, das für die Restriktion der DNA der übrigen (Minimaltyp-) Stämme dieser Klasse verantwortlich ist.

Für die Klasse V konnten weder sequenzspezifische Restriktionsendonukleasen noch wirtsspezifische Bakteriophagen isoliert werden. Im übrigen bestätigt die Analyse der P/M-Systeme der Klassen I bis IV die im Genomstrukturierungsschema von HEUMANN vorgeschlagene Klasseneinteilung und eröffnet damit die Möglichkeit zur Typisierung von *Rhizobiaceen*-Stämmen auf der Basis ihrer P/M-Systeme.

B. EINLEITUNG

Standen bis zum Ende der siebziger Jahre noch Struktur und Funktion der DNA im Mittelpunkt der modernen Molekularbiologie, so setzte sich mit der Entdeckung der transponierbaren Elemente (S20) mehr und mehr die Erkenntnis durch, daß die Anordnung und Reihenfolge der Erbinformation innerhalb der Zelle keineswegs so unveränderlich festgelegt ist wie bisher angenommen. Die "Dynamik der DNA" (W.HEUMANN) befähigt die Organismen vielmehr, ihr Genom in gesetzmäßiger Weise umzustrukturieren. Diese Neuordnung der Gene ermöglicht es der Zelle, ihre potentielle Erbinformation um ein Vielfaches zu erweitern und damit auf ein Spektrum unterschiedlichster Umweltbedingungen durch Ausprägung des am besten geeigneten Phänotyps zu reagieren.

Beispielhaft für eine solche Genomumstrukturierung bei Prokaryonten ist die Familie der *Rhizobiaceen*, eine saprophytisch lebende Gruppe von Bodenbakterien, die besonders durch ihre genetische Wechselwirkung mit Pflanzen charakterisiert ist (H6). Aufgrund der Versatilität ihres Genbestandes sind diese Bakterien in der Lage, unter Streßbedingungen ihr gesamtes Genom in fünf verschiedenen Rastern neu zusammenzusetzen. Als Ergebnis treten fünf neue Klassen von Bakterien mit völlig neuartigen Eigenschaften auf (H7,H9) (Abb.1). Durch genetische, biochemische, molekularbiologische und elektronenoptische Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß bis auf wenige Ausnahmen die im Konversionsschema von HEUMANN (H9) zu einer Klasse zusammengefaßten Bakterienstämme in den wesentlichen Merk-

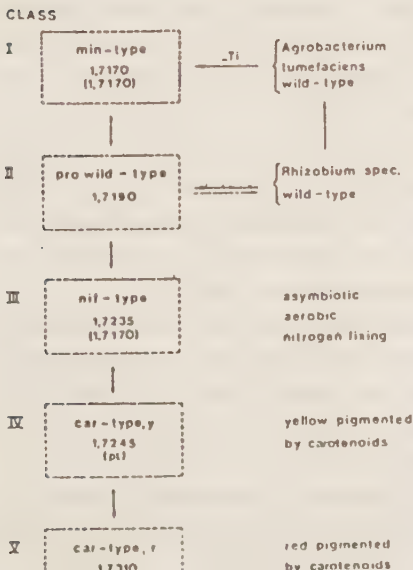


Abb.1 Genomumstrukturierungs-Schema der Rhizobiaceen (H9)

Die Zahlen in den Klammern geben die Dichte der chromosomalen bzw. extrachromosomalen DNA (in Klammern) in g/cm^3 an.

malen übereinstimmen, während sich die Vertreter unterschiedlicher Klassen deutlich voneinander unterscheiden (A2,B4,G9,H6,H8,P10,S1).

Als eine von mehreren Möglichkeiten zur Klassifizierung sehr nahe verwandter Bakterienstämme erwies sich in den letzten Jahren bei einer Reihe von Bakterienfamilien die Untersuchung der sog. "wirts kontrollierten Modifikation und Restriktion" (B8,B15,D6,U1). Dieses Phänomen spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Bakterienzelle vor dem Eindringen artfremden genetischen Materials (A7,A8). Dabei werden mit Hilfe einer Restriktionsendonuklease beide Stränge der Fremd-DNA durchtrennt, sofern die für das jeweilige Restriktionsenzym spezifische Erkennungssequenz auf dem DNA-Doppelstrang vorliegt (A8). Den weiteren, vollständigen Abbau der so erzeugten linearen Fragmente übernehmen zelluläre Nukleasen (B7,M10). Für den Schutz der eigenen DNA vor dem Angriff des Restriktionsenzym sorgt ein Modifikationsenzym, eine Methylase, die dieselbe Nukleotidsequenz erkennt (B1,B14,M5,S14) und innerhalb dieser die DNA durch basenspezifische Methylierung als zelleigen kennzeichnet (A6,K10,S17).

Aufgrund ihrer wesentlichen Merkmale lassen sich die Restriktionsenzyme in mehrere Klassen einteilen (B10,K1,M10). Dabei haben vor allem die Enzyme vom Typ II als Werkzeuge für die molekularbiologische Forschung entscheidende Bedeutung erlangt, da sie im Gegensatz zu Typ I- und Typ III-Enzymen stets definierte lineare DNA-Fragmente von gleichbleibender Länge erzeugen (D1,N1,R2,Z1), die sich mit Hilfe der Agarosegel-Technik (S10) leicht nachweisen lassen. Darüberhinaus war nunmehr die medizinisch und wirtschaftlich durchaus relevante Möglichkeit gegeben, DNA-Fragmente unterschiedlicher Herkunft gentechnologisch so zu verknüpfen, daß die resultierende neu kombinierte Erbinformation von geeigneten Bakterien als sinnvoll erkannt wurde (D5,G12,M1,M6,M11,M12,T2), was letztlich zur Massenproduktion der gewünschten Genprodukte führte (G12,H11,J2,M3,N4).

Innerhalb der belebten Natur ließen sich Restriktions- und Modifikationsenzyme bisher zweifelsfrei nur in Bakterien nachweisen (M10). Bis auf ganz wenige Ausnahmen sind sie höchstwahrscheinlich alle Teil eines bakteriellen R/M-Systems, da *in-vitro* bakterieneigene DNA so gut wie nie angegriffen wird (B14,M10). Dabei finden sich häufig Stämme mit nur einem P/M-System, einige wenige besitzen zwei oder mehr solcher Systeme (A9,C7,I2,P2,P3,R2,S10). Restriktionsenzyme, die im Gegensatz dazu die zelleigene DNA *in-vitro* (nicht *in-vivo*) spalten und somit keinem R/M-System angehören, werden als "phänotypisch-kryptisch" bezeichnet (M8,R6). Ihnen wird eine Funktion bei zellulären Integrations- oder Rekombinationsvorgängen zugeschrieben (C1,M8,R6). Von einigen Autoren wird daher diskutiert, ob nicht auch andere Restriktionsenzyme Integrations-, Rekombinations- oder eventuell sogar Repressor-Aufgaben innerhalb der Zelle wahrnehmen

(C1,C6,K9,L3,R5), zumal die Beteiligung von Typ II-Endonukleasen an einer Restriktion *in-vivo* bisher im Gegensatz zu den Enzymen vom Typ I oder III nur in wenigen Fällen demonstriert wurde (B7,M10).

Wenngleich es angezeigt scheint, eine durchgehende Verbreitung von Restriktions- und Modifikationsenzymen innerhalb der Bakterien zu fordern (P2), konnte für viele Stämme noch kein wirtskontrolliertes R/M-System nachgewiesen werden. Innerhalb der Rhizobiaceen gehörten dazu auch lange Zeit die Vertreter der Gattung *Rhizobium*, während von *Agrobacterium* bereits eine Reihe von Restriktionsenzymen beschrieben ist (L3,R3,R5,R6,S8). Erst 1979 wurde mit Rlu-1 I aus *R. lupini* (Stamm 1-624) das erste Restriktionsenzym aus *Rhizobium* isoliert (W3). Die Erkennungssequenz dieses Enzyms wurde 1981 von SIEVERT aufgeklärt (S11). Dabei stellte sich heraus, daß Rlu-1 I mit 5' G C C G G C 3' eine bis zu diesem Zeitpunkt völlig neuartige Nukleotidsequenz erkannte (R7). Erst in jüngster Zeit konnten zwei isoschizomere Endonukleasen isoliert werden (C8,V4).

Es zeigte sich, daß Rlu-1 I offensichtlich Teil eines bakteriellen R/M-Systems war, da, bezogen auf das eingangs erwähnte System von Klassen, weder die bakterieneigene noch die DNA aus Vertretern derselben Klasse (IV) *in-vitro* von Rlu-1 I geschnitten wurde, während jedwede DNA aus einem Vertreter einer anderen Klasse in eine Vielzahl von Fragmenten gespalten wurde (W3). Auch das 1980 isolierte Restriktionsenzym Fre I aus dem der Klasse II angehörenden *R. meliloti*-Stamm 20-1 erwies sich als Bestandteil eines klassenspezifischen P/M-Systems (W3). Damit stellte sich die Aufgabe, das genannte Schema der Genomstrukturierung der

Rhizobiaceen mit Hilfe klassenspezifischer P/M-Systeme zu charakterisieren. Ziel dieser Dissertation war also, durch Anwendung mikrobiologischer, biochemischer und molekularbiologischer Methoden die Restriktions- und Modifikationssysteme der einzelnen Klassen des Konversionsschemas aufzuklären und miteinander zu vergleichen. Dadurch sollte zusätzlich die von HEIMANN vorgenommene, durch andere Untersuchungen nahegelegte Einteilung der Klassen überprüft werden. Die vorliegende Arbeit gibt eine ausführliche Darstellung der R/M-Systeme von drei der fünf Klassen innerhalb des *R. meliloti*-*A. tumefaciens*-Systems sowie eine teilweise Schilderung des Restriktions-/Modifikationsverhaltens der Klasse III. Ferner wird eine verbesserte Methode zum schnellen Nachweis und zur Reinigung von schnittspezifischen Restriktionsenzymen und zur Isolierung von wirtsspezifischen Bakteriophagen aus Erde beschrieben.

C. MATERIAL UND METHODEN

I. BIOLOGISCHES MATERIAL

1. BAKTERIENSTÄMME

1.1. Rhizobium- und Agrobacterium-Wildtypstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab.1 zusammengefaßt.

Bakterienstamm	Bezeichnung in der Erlanger Stammsammlung	entstanden aus	Herkunft
A.tumefaciens B6	18-1	Originalstamm (Klasse I)	Kocur, Prag, CSSR
"	18-18	18-1 (" I)	Heumann, Erlangen
"	18-23	K 20-1 (" II)	"
"	18-30	K 8-34 (" II)	"
R.meliloti	MV II/1	Originalstamm (" II)	Kanberger, Erlanger
" 41	20-23	" (" II)	Orosz, Szeged, Ungarn
" SA 2011	20-1	" (" II)	Dénarié, Versailles, Frankreich
"	20-43	K 33-1 (" IV)	Heumann, Erlangen
"	20-45	K 30-18 (" III)	"
"	20-46	K 33-2 (" IV)	"
"	20-47	K 2-28 (" IV)	"
"	20-48	K 3-57 (" IV)	"
"	20-49	K 1-959 (" IV)	"
"	20-50	K 29-1 (" IV)	"
"	20-54	K 4-18 (" V)	"
"	32-3	K 1-37 (" IV)	"
R.leguminosarum 300	8-51	Originalstamm (" II)	Peringer, Norwich, England
R.trifolii 30141	8-34	" (" II)	Heumann, Erlangen (DSM Göttingen)
R.species CB 376	4-42	" (" V)	Broughton, Köln (CSIRO Australien)

Tab.1 Verwendete Rhizobium- und Agrobacterium-Wildtypstämme

DSM : Deutsche Sammlung von Mikroorganismen

CSIRO : Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization

1.2. Konvertanten-Stämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab.2 zusammengefaßt.

Stamm Nr.	Klassifikation	entstanden aus	Herkunft
31-1	Minimaltyp, Klasse I	K 20-49 (Klasse II)	Heumann, Erlangen
31-4	" "	K 33-2 (" IV)	"
31-12	" "	K 20-1 (" II)	"
31-22	" "	K 18-30 (" I)	Bauer, Erlangen
31-25	" "	K 18-30 (" I)	"
30-6	Nif-Typ, Klasse III	30-1 (" III)	Heumann, Erlangen
30-14	" "	30-1 (" III)	"
30-18	" "	K 33-13 (" IV)	"
30-25	" "	K 20-1 (" II)	"
30-30	" "	K 31-1 (" I)	"
30-32	" "	K 29-1 (" IV)	"
30-33	" "	K 18-1 (" I)	"
30-34	" "	K 18-18 (" I)	"
30-36	" "	K 8-34 (" II)	"
33-1	Car-Typ gelb, Klasse IV	K 20- (" II)	Heumann, Erlangen
33-2	" "	K 20-43 (" II)	"
1-37	" "	1-99 (" IV)	"
1-42	" "	1-99 (" IV)	"
1-56	" "	1-99 (" IV)	"
1-99	" "	K P. lupini (" II)	"
1-624	" "	K 1-34 (" IV)	"
1-932	" "	K 20-1 (" II)	"
29-1	" "	K 18-20 (" I)	"
26-1	" "	K 18-1 (" I)	Hösch, Erlangen

Tab.2 Verwendete Konvertanten-Stämme

(Fortsetzung Tab.2)

Stamm Nr.	Klassifikation	entstanden aus	Herkunft
4-1	Car-Typ rot, Klasse V	Originalstamm (Klasse V)	Heumann, Erlangen
4-17	" "	K R.phaseoli (" II)	"
4-20	" "	K 20-1 (" II)	"
4-22	" "	K 30-18 (" III)	"
4-23	" "	K 20-49 (" II)	"
4-26	" "	K 18-1 (" I)	"
4-27	" "	K 33-1 (" IV)	"

Tab.2 Verwendete Konvertantenstämme (Fortsetzung)

1.3. Sonstige Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme sind in Tab.3 zusammengefaßt.

Bakterienstamm	Herkunft
Bacterium species 4-45	Stolp, Bayreuth
Pseudomonas aeruginosa B4/1	Rösch, Erlangen
Xanthomonas badrii ATCC 11672	Bornkamm, Freiburg
Xanthomonas holcicola ATCC 13461	"
Xanthomonas malvacearum ATCC 9924	"
Escherichia coli K12 HB101	Pühler, Bielefeld
Escherichia coli K12 C600	"
Escherichia coli C	"
Serratia marcescens S _b	Bornkamm, Freiburg
Providencia stuartii 164	"
Bacillus subtilis 168	Heumann, Erlangen
Bacillus circulans 14-24	"
Bacillus globigii	Bornkamm, Freiburg
Bacillus amyloliquefaciens II	"

Tab.3 Sonstige verwendete Bakterienstämme

2. BAKTERIOPHAGEN

Die verwendeten Bakteriophagen sind in Tab.4 zusammengefaßt.

Bezeichnung	Verwendete Abkürzung	Originalwirt	Herkunft
Ø18-1-3	Ø18	18-1, Klasse I	Doldi, R.Winkler, Rösch, Erlangen
Ø31-4-1	Ø31	31-4, "	"
Ø20-1-1	Ø20	20-1, Klasse II	"
Ø32-3-2	Ø32	32-3, "	"
Ø30-33-3	Ø30	30-33, Klasse III	Frey, K.Winkler, Erlangen
Ø33-1-1	Ø33	33-1, Klasse IV	Doldi, R.Winkler, Rösch, Erlangen
Ø1-37-1	Ø1	1-37, "	"
Ø29-1-1	Ø29	29-1, "	"

Tab.4 Verwendete Bakteriophagen-Stämme

3. DNA-SUBSTRATE

3.1. DNA aus Viren

Die verwendeten Virus-DNA-Species sind in Tab.5 zusammengefaßt.

Virus/Phage	Wirt	DNA-Herkunft
Adenovirus-2	HeLa-Zellen	Zur Hausen, Freiburg
λcI857S7	E.coli CSH 45	Rösch, Erlangen
T5	E.coli B	Benzinger, Charlottesville, U.S.A.
T7	E.coli B/1	"
P22 H5	S.typhimurium LT2	"

Tab.5 Verwendete Virus- und Phagen-DNA

3.2. Bakterielle Plasmid-DNA

Die verwendeten Plasmid-DNA-Species sind in Tab.6 zusammengefaßt.

Bezeichnung	isoliert aus	DNA-Herkunft
pMB9	E.coli K12 HB101 (pMB9)	Rösch, Erlangen
pBR322	E.coli K12 HB101 (pBR322)	"
RP4	E.coli K12 C600 SH3 (RP4)	"

Tab.6 Verwendete Plasmid-DNA

3.3. Bakterielle Gesamt-DNA

Zur Restriktionsanalyse wurde mit Ausnahme von 31-18, 31-35, 4-17 und 4-26 die DNA aller in Tab.1 aufgeführten *R.meliloti*- und *A.tumefaciens*-Wildtyp- und der in Tab.2 aufgelisteten Konvertantenstämme verwendet. Zusätzlich wurde DNA der Stämme 4-30, 4-31, 4-33 (Klasse V, HEUMANN, Erlangen), 4-42 (Tab.1, BROUGHTON, Köln) und 4-45 (Tab.3, STOLP, Bayreuth) einbezogen.

DNA aus MV II/1 und *A.tumefaciens*-Stämmen wurde von I.BAUER, Erlangen, alle übrigen DNA-Species von A.RÖSCH, Erlangen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

4. ENZYME

Die verwendeten Enzyme sind in Tab.7 zusammengefaßt.

Bezeichnung	isoliert aus	Verwendungszweck	Bezugsquelle
DNase	Rinderpankreas	Isolierung von Phagen-DNA	Serva, Heidelberg
RNase	"	"	"
Lysozym	Hühnereiweiß	Zellaufschluß	Boehringer, Mannheim
<u>Hind</u> III	H.influenzae Rd	Restriktionsanalyse	"
<u>Eco</u> RI	E.coli RY13	"	Rösch, Erlangen

Tab.7 Verwendete Enzyme

II. CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN

1. NÄHRMEDIEN

1.1. Flüssige Nährmedien

Grundmedien (Vollmedien)

IL (Lab Lemco Broth)	8 g/l (Oxoid, Wesel)
NB (Nutrient Broth)	8 g/l (Difco, Detroit, U.S.A.)

Komplexe Medien

TY (Tryptone-Yeast)	In 1 l sind enthalten:
1) 5 g Bacto-Tryptone	(Difco, Detroit, U.S.A.)
3 g Yeast Extract	(" ")
990 ml H ₂ O	
2) 1,3 g CaCl ₂ · 2 H ₂ O	
10 ml H ₂ O	

Beide Lösungen wurden getrennt autoklaviert und erst nach dem Abkühlen zusammengegeben.

YSM (Yeast-Salt-Mannitol)	In 1 l sind enthalten:
1) 1 g Yeast Extract	(Difco, Detroit, U.S.A.)
0,1 g Mannit	
0,2 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O	
0,1 g NaCl	
0,5 g K ₂ HPO ₄	
990 ml H ₂ O	
2) 0,3 g CaCl ₂ · 2 H ₂ O	
10 ml H ₂ O	

Beide Lösungen wurden ebenfalls getrennt autoklaviert und erst nach dem Abkühlen zusammengegeben. Vorher wurde der pH von Lösung 1 mit NaOH auf 6,9 (Flüssigmedium) bzw. 7,2 (Weichagar) eingestellt.

1.2. Weichagar - und Festmedien

Für Weichagarmedien wurden 7 g/l, für Festmedien 15 g/l Agar (Oxoid, Wesel) zugesetzt.

2. CHEMIKALIEN

Die verwendeten Chemikalien sind in Tab.8 zusammengefaßt.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Diäthylaminoäthyl (DEAE) - Cellulose DE 52	Whatman, Maidstone, U.S.A.
Phosphocellulose (PC) P 11	"
Diatomeenerde	Sik, Szeged, Ungarn
Agarose	Serva, Heidelberg
Natriumdodekylsulfat (SDS)	"
Streptomycesulfat (StrSO_4)	"

Tab.8 Verwendete Chemikalien (in Klammern die im Text verwendeten Abkürzungen)

Alle weiteren Chemikalien ohne speziellen Bezugsnachweis wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen.

3. PUFFER UND ANDERE LÖSUNGEN

Der pH-Wert von Tris/HCl-gepufferten Lösungen kann sich in Abhängigkeit von der Temperatur verändern (S9). Für alle Tris/HCl-haltigen Puffer wurde der pH bei Raumtemperatur eingestellt.

TEM-Puffer (für Zellaufschluß, Ionenaustausch-Chromatographie und Dialysen):

10% (w/v) Glycerin in
 20 mM Tris/HCl pH 8,5
 0,1 mM EDTA
 2 mM 2-Merkaptoäthanol
 2 mM MgCl_2

Für den Zellaufschluß wurde generell Puffer ohne Glycerin verwendet. Zur Dialyse des StrSO_4 -Überstandes während des Schnelltests wurde sowohl Puffer von pH 8,5 als auch pH 7,5 eingesetzt. Zur Endkonzentrierung der gereinigten Enzymlösung wurde der Glyceringehalt auf 50% (w/v) erhöht. Die gesamte Reinigung von Rle I und Atu-31 I wurde bei pH 7,5 durchgeführt.

TM-Puffer (für Zellaufschluß):

10 mM Tris/HCl pH 7,5
 10 mM 2-Merkaptoäthanol

PC-Puffer (für Ionenaustausch-Chromatographie und Dialysen):

10% (w/v) Glycerin in
 10 mM KPO₄ pH 7,4 *
 0,1 mM EDTA
 10 mM 2-Merkaptoäthanol

* Die verwendete KPO_4 -Lösung wurde durch Mischen äquimolarer K_2HPO_4 - und KH_2PO_4 -
Lösungen bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes hergestellt. Zur Endkon-
zentrierung der gereinigten Enzymlösung wurden dem Puffer wiederum 50% (w/v)
Glycerin beigelegt.

Reaktionspuffer für BanHI:

6 mM Tris/HCl	pH 7,4
6 mM 2-Merkaptoäthanol	
6 mM $MgCl_2$	

Zur Enzymstabilisierung wurde dieser und alle weiteren Reaktionspuffer mit
1 mg/ml sterilem Rinderserumalbumin versetzt.

Reaktionspuffer für Hind III:

10 mM Tris/HCl	pH 7,5
50 mM NaCl	
10 mM $MgCl_2$	

Verdünnungspuffer für Hind III:

50% (w/v) Glycerin in	
10 mM Tris/HCl	pH 7,5
50 mM NaCl	
10 mM $MgCl_2$	

Reaktionspuffer für EcoRI sowie Doppelverdauungen mit EcoRI und Hind III:

10 mM Tris/HCl	pH 7,5
100 mM NaCl	
10 mM $MgCl_2$	

Reaktionspuffer für Sma I und Pme I:

15 mM Tris/HCl	pH 8,5
15 mM KCl	
6 mM $MgCl_2$	

Reaktionspuffer für Rlu-1 I, Rle I und Atu-31 I:

12 mM Tris/HCl	pH 9
6 mM $MgCl_2$	

Reaktionspuffer für Atu-18 I:

15 mM Tris/HCl	pH 7,5
20 mM KCl	
6 mM $MgCl_2$	

Reaktionspuffer für Atu-29 I:

10 mM Tris/HCl	pH 8,5
75 mM NaCl	
10 mM $MgCl_2$	

Reaktionspuffer für die "Atu-29 II"-Aktivität:

15 mM	Tris/HCl	pH 8,5
20 mM	KCl	
6 mM	MgCl ₂	

Stopplösung für DNA-Verdauungsreaktionen:

25%	(w/v) Saccharose	
5%	(w/v) SDS	
0,1%	(w/v) Bromphenolblau in	
250 mM	EDTA	pH 8
2,5 M	Harnstoff	

Tris-Acetat-Puffer (für Agarosegelelektrophorese):

40 mM	Tris/HCl	pH 7,8
10 mM	Natriumacetat	
5 mM	EDTA	

Der Puffer wurde stets in 50-facher Konzentration auf Vorrat gehalten und bei Bedarf (unter pH-Kontrolle) verdünnt.

TE-Puffer (zur Aufbereitung, Dialyse und Verdünnung von DNA):

10 mM	Tris/HCl	pH 7,6
1 mM	EDTA	

λ -dil-Puffer (für Bakteriophagen):

10 mM	Tris/HCl	pH 7,4
10 μ g/ml	Gelatine	
1 mM	MgSO ₄	

III. GERÄTE UND HILFSMITTEL

Kühlzentrifuge Sorvall RC-5B (Du Pont, Bad Nauheim), Rotoren SS34 und CSA für Kühlzentrifuge (Du Pont, Bad Nauheim), Präparative Ultrazentrifuge TGA-65 (Kontron, Eching), Rotoren Ti50, Ti60 und Typ 35 für Ultrazentrifuge (Beckman, Palo Alto, U.S.A.), Ultraschallgerät B-12 mit Makrospitze (Branson, Danbury, U.S.A., Automatischer Fraktionssammler Ultrorac 7000 (LKB, Gräfelfing), Spannungsgeber (Hölzel, Dorfen), Transilluminator C61 (Vetter, Wiesloch), Polaroidkamera MP4 und Polaroidfilme 665 (Polaroid, Offenbach), Densitometer (Boskamp), Spektralphotometer Einheiten PMQII und M4QIII (Zeiss, Oberkochen), Glasperlen (Dragon, Bayreuth), Sterilfilter und Filterplättchen (Sartorius, Göttingen), Visking-Dialysiermembranen (Serva, Heidelberg);

IV. BAKTERIENANZUCHT UND ZELLERTE

Von allen Bakterienstämmen wurden je nach Bedarf Flüssigkulturen von 10, 50 oder 100 ml angelegt und bei 30°C über Nacht (langsam wachsende Stämme mindestens für 48 Std.) gerollert oder im Schüttelwasserbad inkubiert. *R. meliloti*-Wildtypstämme wurden in TY, alle anderen *Rhizobiaceen* in LL oder NB, die übrigen Bakterienstämme in NB angezogen. Das Wachstum der Bakterien in Flüssigkultur wurde kontrolliert durch Messung der optischen Dichte bei 650 nm. Als Referenz diente das jeweils unbeimpfte Nährmedium. Nach Erreichen der gewünschten Wuchsphase wurde die Zellsuspension entweder geerntet oder in frisches Medium überimpft und weitervermehrt.

Für Schnelltests auf Restriktionsaktivität wurden die Zellen aus 10-15 Übernachtskulturen (je 100 ml) unmittelbar geerntet. Zur Isolierung von Restriktionsenzymen wurden 4-6 100 ml-Vorkulturen auf die entsprechende Zahl großvolumiger Kolben mit je 2,5 l Medium überimpft und durch Einblasen von steriler Luft bei 30°C weitervermehrt. Für Phagenversuche wurde von logarithmischen Übernachtskulturen ausgegangen, die vor Gebrauch stets entsprechend verdünnt wurden. Die Reinheit der Bakterienkulturen wurde jeweils im Lichtmikroskop und durch Ausstreichen auf NB- oder LL-Festmedium kontrolliert.

Die Ernte der Zellen erfolgte nach Erreichen der erforderlichen Wuchsphase durch 10minütige Zentrifugation (9000 rpm, 4°C). Die geernteten Zellen wurden vereinigt und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20°C tiefgefroren.

V. BAKTERIOPHAGEN-TECHNIKEN

1. WEICHAGARGUSSMETHODE

Der qualitative und quantitative Nachweis von Bakteriophagen erfolgte mit Hilfe der bekannten Weichagargußmethode nach ADAMS (A1). Zum Ausgießen wurden, soweit nicht anders vermerkt, LL- oder NB-Platten bzw. -Weichagar (3 ml pro Platte) verwendet. Pro Platte wurden 0,25 ml Indikatorbakterien (Zelltiter 1×10^8 /ml) ausgegossen. Das betreffende Phagenlysate wurde entweder unverdünnt eingesetzt oder mit sterilem λ -dil-Puffer auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die eingesetzten Phagemengen sind dem jeweiligen Abschnitt dieses Methodenteils zu entnehmen.

Von jeder untersuchten Phagenkonzentration wurden routinemäßig Doppelplatten angelegt. Zur Überprüfung von Bakterienwachstum und -lyse wurden entweder von jedem untersuchten Bakterienstamm Kontrollplatten ohne Phagen ausgegossen oder die

jeweils höchste Verdünnungsstufe der betreffenden Verdünnungsreihe zur Kontrolle herangezogen. Die Reinheit der Bakterienkulturen wurde durch Ausstreichen einer Weichagarprobe des Bakterienrasens auf LL- oder NE-Platten überprüft. Alle Platten wurden über Nacht oder (im Fall der langsamwachsenden Stämme der Klasse V sowie bei allen Versuchen mit Ø30) 40 Std. bei 30°C inkubiert.

2. ISOLIERUNG VON BAKTERIOPHAGEN

2.1. Isolierung von Phagen aus dem Erdboden

Die Isolierung, Identifizierung und Reinigung der Phagen erfolgte in enger Anlehnung an die klassischen Methoden von ADAMS (A1).

Zur Gewinnung des phagenhaltigen Rohlysats wurden 600-800 ml der jeweiligen Erdprobe mit λ -dil-Puffer gut durchfeuchtet und 24 Std. bei 30°C inkubiert. Grobe Erdpartikel wurden durch 10minütige Zentrifugation (8000 rpm, 4°C) sedimentiert und die überstehende Erdsuspension durch insgesamt drei Filterlagen von abnehmender Porengröße (2, 0,8 und 0,45 μ m Durchmesser) gepreßt. Das erhaltene Filtrat wurde durch niedertouriges Zentrifugieren (10 Min. 10 000 rpm, 4°C) geklärt. Nach hochtouriger Zentrifugation des Überstandes (2 Std. 34 000 rpm, 4°C) wurde der Niederschlag in λ -dil-Puffer (0,5 ml Puffer pro 100 ml Überstand) aufgenommen und durch Stehenlassen über Nacht bei 4°C gelöst. Dieses konzentrierte Phagenlysate wurde erneut 10 Min. zentrifugiert (10 000 rpm, 4°C) und der die Phagen enthaltende Überstand mit einigen Tropfen Chloroform zellfrei gemacht.

Die Identifizierung möglicher wirtsspezifischer Phagen erfolgte nach Auftropfen steigender Volumina (10, 50 und 100 μ l) des jeweiligen Rohlysats auf die zuvor mit Weichagar ausgegossenen Bakterien. Die Auswertung der Platten geschah erstmals nach 8 Std., wobei die Platten nach 16, 24 und 48 Std. erneut kontrolliert wurden. Plaqueähnliche Hemmhöfe wurden mit jeweils einem sterilen Zahnstocher angestochen und das so isolierte Material, nach Plaquetypen getrennt, in sterilem λ -dil-Puffer resuspendiert (0,5 ml für jeweils drei Stocher). Nach 1 Std. wurde alles Puffermaterial, soweit es vom gleichen Plaquetyp herrührte, vereinigt und entweder steriltfiltriert (bei mehr als 1 ml Volumen) oder mit Hilfe von Chloroform steril gemacht.

Zur Reinigung der Phagenlysate wurde eine Verdünnungsreihe in sterilem λ -dil-Puffer angelegt (Stufen 10^0 bis 10^{-4}) und von jeder Verdünnungsstufe 0,1 ml zusammen mit 0,25 ml des Wirtsstammes ausgegossen. Getrennt liegende Einzelplaques wurden wiederum mit Hilfe jeweils eines sterilen Zahnstochers angestochen, wobei nunmehr das abgenommene Material eines jeden Einzelplaques

separat in 1 ml λ -dil-Puffer resuspendiert wurde. Dieses Lysat wurde sterilfiltriert und vollständig auf die zuvor mit Weichagar ausgegossenen Indikatorbakterien aufgetropft. Aus den entstandenen Hemmhöfen wurde die Weichagarschicht mit Hilfe eines sterilen Spatels abgekratzt und in sterilen λ -dil-Puffer (2 ml pro Hemmhof) überführt. Nach 2-3 Std. wurden Weichagar und Bakterien durch 10minütiges Zentrifugieren (12 000 rpm, 4°C) sedimentiert und der phagenhaltige Überstand sterilfiltriert. Vom Filtrat wurde erneut eine Verdünnungsreihe in sterilem λ -dil-Puffer angelegt (Stufen 10^0 bis 10^{-8}) und wie vorher beschrieben zu Einzelplaques ausgegossen. Insgesamt wurden zur Reinigung eines jeden Phagenlysats mindestens drei Einzelplaquepassagen durchgeführt.

2.2. Phagenisolierung nach Vermehrung auf fremden Wirten

Die Isolierung der Phagen aus anderen als den ursprünglichen Wirten erfolgte aus den auf dem fremden Wirt erzeugten Einzelplaques oder Hemmhöfen in der oben beschriebenen Weise, wobei die Phagen nun jeweils auf dem neuen Wirt vermehrt wurden.

3. ANREICHERUNG DER GEREINIGTEN PHAGEN

Die Anreicherung der isolierten und gereinigten Phagen erfolgte wahlweise auf Platten (mit Hilfe der Weichagargußmethode) oder in Flüssigkultur, je nachdem ob ihre Vermehrung auf anderen Wirten untersucht oder die Phagen-DNA isoliert werden sollte. Sämtliche Phagen wurden prinzipiell auf dem Wirt angereichert, für den sie spezifisch isoliert worden waren.

3.1. Phagenanreicherung auf Platten

3.1.1. Routineanreicherung

Gewöhnlich erfolgte die Anreicherung auf Platten durch Auftropfen des gereinigten Phagenlysats nach Ausgießen der zugehörigen Indikatorbakterien mit Weichagar. Je nach Phagentiter und vorhandener Menge wurden pro Platte 100-500 μ l des betreffenden Lysats aufgetropft, wobei mindestens vier Platten angelegt wurden. Aus den entstandenen Hemmhöfen wurde wiederum die Weichagarschicht abgekratzt, in sterilem λ -dil-Puffer resuspendiert und nach 2-3 Std. niedertourig abzentrifugiert. Der phagenhaltige Überstand wurde sterilfiltriert. Das erhaltene Phagenlysats wurde im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und als Ausgangsmaterial für alle weiteren Versuche verwendet.

3.1.2. Hochanreicherung durch konfluente Lyse

Die Hochanreicherung der Phagen auf Platten erfolgte mit dem angereicherten Lysat durch sog. "konfluente Lyse", wobei je nach der erforderlichen Phagenmenge zwischen 50 und 300 Platten angelegt wurden. Pro 50 Platten wurden 12,5 ml Indikatorbakterien (Zelltiter 1×10^8 /ml) mit 5 ml Phagenlysat ($5 \times 10^7 - 1 \times 10^8$ Phagen) gemischt und so eine m.o.i. von 0,05 - 0,1 eingestellt. Gegebenenfalls wurde das verwendete Phagenlysat vorher mit sterilem λ -dil-Puffer verdünnt. Zur Adsorption der Phagen an die Bakterien wurde das Infektionsgemisch 10 Min. stehengelassen. Sodann wurden pro Platte 0,35 ml des Gemisches mit Weichagar ausgegossen.

Zur Ernte der Phagen wurde die gesamte Weichagarschicht einer jeden Platte steril abgekratzt und in sterilem λ -dil-Puffer (hier entsprechend 4 ml pro Platte) überführt. Nach 2-3 Std. wurden Weichagar und Bakterien durch 10-minütiges Zentrifugieren (12 000 rpm, 4°C) sedimentiert. Im Gegensatz zur routinemäßigen Anreicherung wurde der phagenhaltige Überstand aber zunächst nicht sterilfiltriert, sondern unmittelbar durch hochtourige Zentrifugation konzentriert (siehe 3.3.).

3.2. Phagenanreicherung in Flüssigkultur

3.2.1. Erstanreicherung der Phagen

Die Anreicherung in Flüssigkultur erfolgte nach der Methode von TRAEG in zwei Stufen (T3). Zur sog. Erstanreicherung der Phagen wurde eine logarithmische Übernackkultur des jeweiligen Wirtsstammes durch Überimpfen in frisches Medium (Endvolumen pro Röhrchen 10 ml) auf einen Zelltiter von 1×10^8 /ml verdünnt. Anschließend wurden die Kulturen mit einer Multiplizität von 0,02 - 0,05 mit dem betreffenden Phagenlysat infiziert und weiter bei 30°C inkubiert, wobei auf gute Durchlüftung geachtet wurde. Zur Kontrolle von Bakterienwachstum und -lyse wurden Parallelröhrchen ohne Phagenzusatz in gleicher Weise ge-rollert. Von allen infizierten und nichtinfizierten Kulturen wurde in regelmäßigen Abständen die optische Dichte (OD) bei 650 nm gegen das jeweils unbeimpfte Nährmedium als Referenz gemessen. Unmittelbar nach Erreichen des minimalen OD-Wertes wurden durch Zugabe von einigen Tropfen Chloroform alle noch lebensfähigen Bakterien abgetötet und durch 10minütige Zentrifugation (10 000 rpm, 4°C) die Suspension von Zellen und -bruchstücken befreit. Der phagenhaltige Überstand wurde sterilfiltriert.

3.2.2. Hochanreicherung der Phagen

Die Hochanreicherung von Phagen in Flüssigkultur wurde mit Hilfe des im vorherigen Schritt angereicherten Lysats durchgeführt. Zur Erhöhung der Phagenausbeute wurde die dort beschriebene Phagenvermehrung in größeren Volumina durchgeführt, wobei eine m.o.i. von 2-3 eingestellt wurde. Anstelle der niedertourigen Zentrifugation im Anschluß an die Chloroformbehandlung der noch lebensfähigen Zellen wurde das gesamte Bakterien-Phagen-Gemisch zunächst mit Diatomeenerde versetzt und über Nacht bei 4°C stehengelassen. Aus der Suspension wurden Diatomeenerde und anhaftende Partikel mittels eines Glasfilters abfiltriert und das Filtrat 10 Min. zentrifugiert (10 000 rpm, 4°C). Auch hier wurde der phagenhaltige Überstand zunächst nicht sterilfiltriert, sondern in der in 3.3. beschriebenen Weise konzentriert.

3.3. Konzentrierung der Phagenlysate

Zur Konzentrierung der hochangereicherten Lysate schloß sich unmittelbar an die niedertourige Zentrifugation eine hochtourige Sedimentation des phagenhaltigen Überstandes an (2 Std. 34 000 rpm, 4°C), bei der die Phagen pelletiert wurden. Der Niederschlag wurde in λ -dil-Puffer aufgenommen (0,5 ml pro 100 ml Überstand) und durch Stehenlassen über Nacht bei 4°C resuspendiert. Das konzentrierte Phagenlysat wurde anschließend nochmals 10 Min. zentrifugiert (12 000 rpm, 4°C), der Überstand vorsichtig abgenommen und sterilfiltriert.

4. METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER PHAGEN-WIRTSPEZIFITÄT

4.1. Tropftests

Zur qualitativen Untersuchung der Phagenvermehrung auf unterschiedlichen Wirten (Phagentypisierung) wurde die gewünschte Menge an Phagenlysat auf die zuvor mit Weichagar ausgegossenen Bakterien aufgetropft, wobei die verwendeten Phagenlysate in aller Regel über Platte angereichert wurden. Alle Versuche wurden außer auf LI- und NB-Platten auch auf TY- und YSM-Platten (mit dem entsprechenden Weichagar) durchgeführt.

Je nach Fragestellung wurden entweder 10^5 oder 10^{10} Phagen pro Platte und Stamm aufgetropft. Für einfache Tropftests (mit 10^5 Phagen) waren die routinemäßig angereicherten Phagenlysate aus 3.1. (S.17) ausreichend. Zum Auftropfen größerer Phagenmengen wurden hochtitrige Lysate verwendet, die überwiegend durch konfluente Lyse angereichert und gemäß 3.3. (siehe oben) konzentriert wurden.

4.2. Quantitative Bestimmung der Phagenvermehrungsrate

Um den Titer der plaquebildenden Phagen für einen bestimmten Bakterienstamm zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Lysats oder Bakterien-Phagen-Gemisches in sterilem λ -dil-Puffer angelegt und von bestimmten Verdünnungsstufen Proben entnommen und zusammen mit Indikatorbakterien und Weichagar ausgegossen. Zur Auswertung wurden nach Möglichkeit Platten mit 50-300 Einzelplaques ausgezählt. Aus dem Mittelwert der Parallelplatten wurde unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufe und des eingesetzten Volumens der jeweilige Phagentiter errechnet.

4.2.1. Grobtiterbestimmung

Wo lediglich die Phagenkonzentration eines gegebenen Lysats ermittelt werden sollte, wurde eine Grobtiterbestimmung auf dem zugehörigen Wirt vorgenommen. Für routinemäßig über Platten oder Flüssigkultur (Erstanreicherung) vermehrte Lysate wurden die Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-8} angelegt, wobei die Stufen 10^{-4} bis 10^{-8} ausgetestet wurden. Hochangereicherte Lysate wurden bis zur Stufe 10^{-11} verdünnt und daraus die Stufen 10^{-7} bis 10^{-11} untersucht. In beiden Fällen wurden jeweils 0,25 ml Indikatorbakterien und 0,1 ml der entsprechenden Verdünnungsstufe mit Weichagar ausgegossen.

4.2.2. Komplextiterbestimmung

Zur Ermittlung der Vermehrungsrate auf fremden Wirten wurde sowohl für den neuen wie auch für den ursprünglichen Wirt die übliche Komplextiterbestimmung durchgeführt und daraus die Effektivität des Plattierens (e.o.p.) errechnet. In allen Experimenten wurde eine m.o.i. von 1 eingehalten.

Zur normalen Komplextiterbestimmung wurden pro 10 Platten $2,5 \times 10^8$ Bakterien mit derselben Anzahl Phagen vermischt und zur Komplexbildung 10-15 Min. stehen gelassen. Anschließend wurde (noch vor der Lyse der Bakterien) möglichst schnell eine Verdünnungsreihe angelegt (Stufen 10^0 bis 10^{-8}) und von jeder Stufe 0,1 ml zusammen mit 0,25 ml derselben Indikatorbakterien mit Weichagar ausgegossen.

Bei Überlebensraten $< 10^{-5}$ wurde eine variierte Komplextiterbestimmung durchgeführt, bei der die Übermalkultur der Bakterien vor der Infektion nunmehr auf einen Zelltitert von 1×10^9 /ml verdünnt und je Platte 1×10^9 Bakterien (1 ml) und ebensoviele Phagen gemischt wurden. Um das zugegebene Lysatvolumen möglichst klein (≤ 10 μ l) zu halten, wurden nur hochkonzentrierte Lysate verwendet. Von diesem Komplexgemisch wurden die Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-2} (fremder Wirt) bzw. 10^0 bis 10^{-8} (augenblicklicher Wirt) angelegt. Von der Ver-

dünnungsstufe 10^0 (fremder Wirt) wurde sofort 1 ml zusammen mit 0,25 ml Indikatorbakterien mit Weichagar ausgegossen, wobei der Weichagar in entsprechend konzentrierter Form angewendet wurde, um den durch das ausgegossene Volumen bewirkten Verdünnungseffekt zu kompensieren. Von dieser Stufe wurden 10-20 Platten angelegt. Weiterhin wurden von Verdünnungsstufen 10^0 bis 10^{-2} (fremder Wirt) bzw. 10^{-5} bis 10^{-8} (derzeitiger Wirt) je 0,1 ml zusammen mit 0,25 ml Indikatorbakterien auf Parallelplatten ausgegossen. Im Gegensatz zum Infektionsgemisch wurden die Indikatorbakterien stets in der ursprünglich angegebenen Konzentration (1×10^8 /ml) verwendet.

5. PRÄPARATION DER PHAGEN-DNA

5.1. Isolierung der Phagen-DNA

Zur Präparation der Phagen-DNA wurden die jeweiligen Lysate über Flüssigkultur angereichert, wobei stets hochkonzentrierte Phagenlysate verwendet wurden. Eventuell noch anhaftende DNA- oder RNA-Moleküle wurden durch 1stündige Inkubation mit DNase und RNase (jeweils 10 µg/ml) zerstört.

Zur DNA-Isolierung wurde die jeweilige Phagenpräparation, wie auf S.25 beschrieben, mehrmals mit dem gleichen Volumen an frisch bereitetem, TE-Puffer-gesättigtem Phenol ausgeschüttelt (deproteinisiert), bis keine proteinhaltige Interphase mehr zu erkennen war. Damit wurde gleichzeitig auch die Beseitigung aller DNA-abbauenden Nukleasen sichergestellt.

5.2. Aufbereitung der Phagen-DNA

Zur Entfernung des restlichen Phenols wurde die deproteinisierte DNA-Lösung im Laufe von 24 Std. gegen insgesamt 3 mal 2 l sterilen TE-Puffers (bei 4°C) dialysiert, wobei der Dialysepuffer erstmals nach 3 Std. und nach weiteren 3 Std. zum zweiten Mal gewechselt wurde. Vor der letzten Dialyse wurde die DNA-Präparation mit Hilfe von Saccharose auf ca. 1/5 bis 1/10 ihres ursprünglichen Volumens eingeengt.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im ultravioletten Bereich von 230 bis 300 nm, gegen TE-Puffer als Referenz. Dabei entspricht eine Extinktionseinheit bei 254 nm (und 1 cm Schichtdicke) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (S7). Gleichzeitig gibt das Verhältnis $\text{OD}_{280}/\text{OD}_{260}$ ein Maß für die Reinheit der isolierten DNA (L2). Gegebenenfalls wurde die DNA durch Äthanol-fällung konzentriert.

VI. NACHWEIS, REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON RESTRIKTIONS-ENZYMEN

1. SCHNELLER NACHWEIS VON RESTRIKTIONSENZYMEN

Zum schnellen Nachweis von schnittspezifischen Restriktionsenzymen wurde die in der Diplomarbeit beschriebene Methodik durchgeführt (W3), wobei ein verbessertes Zellaufschlußverfahren angewandt wurde. Die verwendeten Zellen (jeweils 3-5 g) wurden in der spätlogarithmischen Phase (OD_{650} ungefähr 1), der Stamm 29-1 bei einer OD_{650} von 0,7 geerntet.

Zur Präparation des Rohlysats wurden die aufgetauten Zellen in drei Volumen glycerinfreiem TEMM-Puffer (pH 8,5) resuspendiert und nach Zugabe von Lysozym (5 mg/ml in H_2O , frisch bereitet) bis zu einer Endkonzentration von 0,4-0,5 mg/ml unter langsamem Rühren 1 Std. im Eisbad inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zur Unterstützung der folgenden, insgesamt 6-minütigen Ultraschallbehandlung wurden der Zellsuspension Glasperlen (1 g pro 3 g Zellen) beigegeben und der gesamte Vorgang unter vorsichtigem Rühren durchgeführt. Die Lyse der Bakterien wurde durch Messung der optischen Dichte bei 650 nm verfolgt. Aus der beschallten Suspension wurden grobe Zellbruchstücke und Glasperlen durch 10-minütige Zentrifugation bei 10 000 rpm entfernt. Die überstehende Lösung wurde 1-1,5 Std. bei 34 000 rpm zentrifugiert, der hierbei erhaltene Überstand unter langsamem Rühren tropfenweise mit 10%iger (w/v) Streptomycinsulfat-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 1% (w/v) versetzt. Die Fällung wurde mindestens 30 Min. weitergerührt, sodann 15 Min. bei 12 000 rpm abzentrifugiert, der Überstand halbiert und über Nacht zur einen Hälfte gegen 5 l TEMM-Puffer von pH 8,5, zur anderen Hälfte gegen das gleiche Volumen desselben Puffers von pH 7,5 dialysiert.

Zum Nachweis von schnittspezifischen Restriktionsenzymen im dialysierten $StrSO_4$ -Überstand wurden unterschiedliche DNA-Substrate unter verschiedenartigen Reaktionsbedingungen (siehe Ergebnisteil S.29) mit je 10 bzw. 20 μ l des Überstands verdaut und das Ergebnis mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese ausgewertet. Zusätzlich wurden enzymfreie DNA-Kontrollen gemacht.

2. REINIGUNG VON SCHNITTSPEZIFISCHEN RESTRIKTIONSENZYMEN

Die Reinigung der schnittspezifischen Restriktionsenzyme geschah in enger Anlehnung an die in der Diplomarbeit beschriebene Methode (W3), wobei, abgesehen vom bereits erwähnten modifizierten Aufschlußverfahren, ein zusätzlicher Reinigungsschritt in Form einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung eingeführt wurde.

2.1. Präparation des enzymhaltigen Rohlysats

Aufschluß der Bakterienzellen und Präparation des enzymhaltigen Rohlysats (dialysierter StrSO₄-Überstand) geschahen in der oben beschriebenen Weise. Die Stämme 18-1, 31-4, 30-33 und 4-22 wurden zusätzlich in TM-Puffer aufgeschlossen. Pro Isolierung wurden 25-40 g Zellen (Naßgewicht) aufgearbeitet. Dies machte eine Erhöhung der Beschallungsdauer auf maximal 9 Min. erforderlich. Die weitere Reinigung wurde für in TM-Puffer aufgeschlossene Zellen in PC-Puffer durchgeführt. Bei allen übrigen Reinigungen wurde TEMM-Puffer (pH 7,5 für 31-4 und 8-51, ansonsten pH 8,5) verwendet. Während der gesamten Reinigung wurde eine Temperatur von 4°C eingehalten.

2.2. Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Im Anschluß an die Dialyse des StrSO₄-Überstands wurde zunächst durch langsame Zugabe von feingepulvertem Ammoniumsulfat unter leichtem Rühren eine 50%ige Sättigung der Lösung erreicht. Die dazu erforderliche Menge (NH₄)₂SO₄ wurde in Abhängigkeit vom Volumen des StrSO₄-Überstands aus der Gleichung von SCOPES (S9) errechnet. Nach der Fällung wurde die Lösung für mindestens 30 Min. weitergerührt und anschließend 15 Min. bei 12 000 rpm zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde nun in der gleichen Weise verfahren wie vorher, wobei nacheinander eine 70- und nach erneuter Zentrifugation eine 100%ige Sättigung der Lösung erzielt wurde. Der nach jedem Zentrifugationsschritt erhaltene Niederschlag von Proteinen wurde in 2-3 Volumen PC- bzw. TEMM-Puffer aufgenommen und bis zur vollständigen Lösung bei 4°C aufbewahrt. Sodann wurden alle gelösten Niederschläge und zur Kontrolle auch der Überstand der letzten Fällung für mindestens 3 Std. gegen 5 l PC- bzw. TEMM-Puffer dialysiert.

2.3. Trennung der Proteine über Phosphocellulose

Die nun folgende Kationenaustausch-Trennung wurde in einer Glassäule (2,5 cm Ø x 30 cm) durchgeführt, die mit frisch bereiteter oder regenerierter Phosphocellulose gepackt und mit PC- bzw. TEMM-Puffer äquilibriert war. Hierzu wurde die entsprechende Ammoniumsulfat-Fraktion ohne weitere Vorbehandlung auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde mit mindestens 50 ml Säulenpuffer nachgewaschen. Während des Beladens und Nachspülens wurde der Säulendurchlauf gesondert aufgefangen. Während der gesamten Ionenaustausch-Trennung betrug die Tropfgeschwindigkeit maximal 30 ml/Std. Die einzelnen Proteinkomponenten wurden mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0-1 M KCl eluiert. Das Gesamtvolumen des Gradienten betrug 400-500 ml. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 8-10 ml aufgefangen.

Der lineare Verlauf des Gradienten wurde durch Messung der Leitfähigkeit des fraktioniert aufgefangenen Eluats kontrolliert. Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht gegen 5 l Isolierungspuffer dialysiert.

2.4. Trennung der Proteine über DEAE-Cellulose

Die über Phosphocellulose gereinigte und dialysierte Enzymprobe wurde weiter über DEAE-Cellulose (Kationenaustauscher) getrennt. Hierfür wurde eine kleinere Glassäule (2 cm Ø x 20 cm) verwendet. Zur Elution wurde ein Gradientenvolumen von 200-300 ml gewählt. Ansonsten war die Trennung in Vorbereitung und Durchführung mit der beschriebenen Trennung über Phosphocellulose identisch.

2.5. Konzentrierung der Enzymlösung

Die gereinigte Enzymlösung wurde schließlich durch Wasserentzug auf ca. 1/6 ihres Volumens eingeeengt. Dazu wurde ein mit Puffer angefeuchteter Dialyseschlauch, der die Enzymlösung enthielt, in einem Meßzylinder mit vorgekühlter, fester Saccharose bedeckt. Sobald das Volumen der Enzymlösung auf etwa ein Drittel geschrumpft war, erfolgte die Endkonzentrierung durch Dialyse gegen 2 l PC- bzw. TEMM-Puffer mit 50% (w/v) Glycerin. Die konzentrierte Enzymlösung wurde portionsweise bei -20°C tiefgefroren.

2.6. Austesten der Enzymfraktionen

Parallel zum jeweiligen Reinigungsschritt wurde das Vorhandensein der gewünschten Restriktionsaktivität in jeder anfallenden Enzymfraktion mittels Verdauungsansatz und Agarosegelelektrophorese geprüft und unter Berücksichtigung ihres Gehalts an unspezifischen Nukleasen die jeweils aktiv(st)en Fraktion(en) zur Weiterreinigung verwendet. Zur Kontrolle wurde, außer beim Test der Phospho- und DEAE-Cellulose-Fractionen, stets die gleiche Menge DNA ohne Enzym derselben Behandlung unterworfen. Testspaltungen mit dialysiertem StrSO_4 -Überstand wurden mit unterschiedlichen DNA-Substraten unter verschiedenartigen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Als DNA-Proben wurden die Plasmide pMB9 und RP4 sowie die DNA der Phagen λ und T7 eingesetzt. Die Verdauung erfolgte unter den Bedingungen des BamHI-, Sma I-, Rlu-1 I-, Hind III- und EcoRI-Reaktionspuffers. Für alle im Verlauf der weiteren Enzymreinigung erforderlichen Testspaltungen wurden daraus der optimale Reaktionspuffer und das am besten geeignete DNA-Substrat ausgewählt. Die bei jedem Test angewandten Inkubationsbedingungen und Enzymmengen sind aus Tab.9 ersichtlich. Für pMB9-Spaltungen wurden wahlweise Plasmid- oder durch vorangegangene EcoRI-Verdauung linearisierte DNA-Proben verwendet.

Reinigungsfraction	eingesetztes Volumen	Inkubations-temperatur	Inkubations-dauer
Dial.StrSO ₄ -Überstand	10,20 µl	4°C, Raumtemp., 37°C	30 Min., 1 Std.
Dial. (NH ₄) ₂ SO ₄ -Frakt.	3,5,10 µl	Raumtemp., 37°C	1 Std.
Phosphocellulose-Fr.	20 µl	37°C	1 Std.
DEAE-Cellulose-Frakt.	20 µl	37°C	1 Std.
Eingeengtes R.enzym	3,5,10,15,20 µl	Raumtemp., 30°C, 37°C	1,2,4 Std.

Tab.9 Inkubationsbedingungen für Testspaltungen im Verlauf der Enzymreinigung

3. SPALTUNG VON DNA MIT RESTRIKTIONSENZYMEN

3.1. Deproteinisierung von DNA

Für Spaltungen wurden generell deproteinisierte DNA-Proben verwendet. Dazu wurde die jeweilige DNA-Präparation mit dem gleichen Volumen an TE-Puffer-gesättigtem Phenol (frisch bereitet) ausgeschüttelt und durch niedertourige Zentrifugation (5 Min. 5000 rpm, 20°C) die Phasentrennung verbessert. Die DNA-haltige Phase wurde abgezogen und erneut mit Phenol extrahiert. Der gesamte Vorgang wurde solange wiederholt, bis keine proteinhaltige Interphase mehr zu erkennen war. Zur Entfernung des restlichen Phenols wurde die DNA-Präparation, wie in V.5.2. (S.21) beschrieben, ausgiebig gegen TE-Puffer dialysiert.

3.2. Äthanolfällung von DNA

Zur Konzentrierung von DNA wie auch im Anschluß an die jeweils erste Spaltung einer Doppelverdauung (außer mit EcoRI und Hind III) wurden die betreffenden DNA-Proben zunächst mit 1/10 des Volumens an sterilem Natriumacetat (3 M) und daran anschließend mit dem ca. 2fachen Volumen an eiskaltem Äthanol (-20°C) versetzt und kräftig geschüttelt. Dieses Gemisch wurde über Nacht bei -20°C stehengelassen und danach 5 Min. bei 12 000 rpm in der Kälte (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgezogen, der Niederschlag 15 Min. im Exsikkator getrocknet und im gewünschten Volumen an sterilem TE-Puffer (5-10 µl je Spaltungsansatz) resuspendiert.

3.3. DNA- und Enzymkonzentration

Die jeweils einzusetzende optimale DNA-Menge wurde nach spektralphotometrischer Bestimmung ihrer Konzentration gemäß V.5.2. (S.21) über eine Verdünnungsreihe der DNA und nachfolgender Agarosegelelektrophorese jeweils neu ermittelt und lag

gewöhnlich zwischen 0,3 und 3 µg je Reaktionsansatz. Für jedes gereinigte Restriktionsenzym wurde die einzusetzende Konzentration ebenfalls über eine Verdünnungsreihe ermittelt. Dazu wurden gleiche Mengen an Test-DNA mit steigender Enzymkonzentration unter Standardbedingungen (siehe den folgenden Punkt 3.4.) gespalten. Die niedrigste Konzentration, die hierbei bereits vollständige Spaltung erbrachte, wurde als ausreichende Enzymmenge angesehen und ist im Text des Ergebnisteils angegeben.

3.4. Reaktionsbedingungen

Die für alle im Verlauf einer Enzymreinigung durchgeführten Testspaltungen angewandten Reaktionsbedingungen gehen aus Tab.9 (S.25) und dem jeweiligen Abschnitt des Ergebnisteils hervor. Verdauungen mit gereinigten Restriktionsenzymen wurden üblicherweise unter Standardbedingungen durchgeführt, die für jedes erstmals isolierte Enzym durch Variation der Reaktionsbedingungen in Hinblick auf die vollständigste DNA-Spaltung jeweils neu bestimmt wurden. Diese Reaktionsbedingungen sind in der Tab.13 des Ergebnisteils (S.36) zusammengefaßt. Die Standardbedingungen für EcoRI- und Hind III-Verdauungen gehen aus Tab.10 hervor.

Restriktionsenzym	Reaktionspuffer	Inkubationsbedingungen
<u>EcoRI</u> <u>Hind</u> III	EcoRI-P. Hind III-P.	2 Std. 37°C "

Tab.10 Standard-Reaktionsbedingungen für Spaltungen mit EcoRI und Hind III

Reaktionsansätze mit bakterieller Gesamt-DNA wurden ebenso wie EcoRI/Hind III-Doppelverdauungen prinzipiell 2 Std. inkubiert. Für EcoRI/Hind III-Doppelverdauungen wurde die DNA unter EcoRI-Reaktionsbedingungen gleichzeitig mit beiden Restriktionsenzymen in einem Ansatz gespalten, bei allen anderen Doppelverdauungen wurde zwischen den einzelnen Verdauungen eine Äthanolfällung der gespaltenen DNA durchgeführt. Für die anschließende zweite Verdauung wurde die einzusetzende DNA-Menge gemäß 3.3. (S.25) jedesmal neu bestimmt.

3.5. Durchführung von Spaltungen

Das Gesamtvolumen jedes Reaktionsansatzes betrug je nach Anteil der zugesetzten DNA-Lösung 50 oder 60 µl. DNA-Proben, deren Volumen 20 % des gesamten Reaktionsansatzes überstiegen hätte, wurden vor der Verdauung durch Äthanolfällung kon-

zentriert. Um das Probenvolumen klein zu halten, wurde 10fach konzentrierter Reaktionspuffer verwendet. Zu Beginn der Spaltung wurden 10fach-Reaktionspuffer (5 oder 6 μ l), steriles Wasser (deionisiert), DNA und Restriktionsenzym (bzw. die entsprechende Fraktion der Enzymreinigung) in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert und in einem Wasserbad mit der vorgeschriebenen Temperatur inkubiert. Nach der angegebenen Inkubationsdauer wurde die Verdauungsreaktion durch Hitzebehandlung (10 Min. im 70°C-Wasserbad) gestoppt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze sofort auf Eis gestellt und nach einigen Minuten mit je 10 μ l einer Bromphenolblau- ("Stop-") Lösung versetzt. Für die nun folgende Gelelektrophorese wurde jeweils der gesamte Reaktionsansatz auf das Agarosegel aufgetragen.

4. AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Der Nachweis von Restriktionsenzymen bzw. der durch sie erzeugten DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe der Agarosegel-Technik nach SHARP et al. (S10). In dieser Arbeit wurde eine nur für vertikale Gele geeignete Elektrophoreseapparatur verwendet, die von BLOHM (GBF, Braunschweig-Stöckheim) entwickelt und nach dessen Vorschrift an unserem Institut nachgebaut wurde.

4.1. Elektrophoresebedingungen

Die Laufbedingungen der Elektrophorese (Spannung bzw. Stromstärke, Laufzeit und Agarosekonzentration) waren vom gewünschten Trennungseffekt abhängig und sind den Legenden der jeweiligen Abbildungen zu entnehmen. Die Gelkonzentration variierte zwischen 0,4 und 2,5 % Agarose, wobei in der Regel mit 0,7- oder 0,8%igen Gelen gearbeitet wurde. Wo gute Trenneffekte benötigt wurden, ließ man die aufgetragenen DNA-Proben 5 Min. bei 80-100 V ins Gel einwandern und setzte die Elektrophorese (für ca. 14-16 Std.) mit 1,2 V/cm fort. In allen anderen Fällen wurde die Elektrophorese bei ca. 4 V/cm, für 2-3 Std., durchgeführt. Die gewünschte Laufzeit richtete sich nach der von der Bromphenolblau-Bande jeweils zurückgelegten Wanderstrecke. Zur Ausschaltung von Diffusionseinflüssen wurden die Elektrophoresen grundsätzlich bei 4°C betrieben.

4.2. Auswertung der Gele

Nach beendeter Elektrophorese wurden die Gele im Dunkeln 45-60 Min. in einer Äthidiumbromid-Lösung (1 μ g/ml in H₂O) gefärbt. Die DNA-Banden wurden im ultravioletten Licht (254 nm) sichtbar gemacht und mit einer Polaroidkamera photographiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung von DNA-Fragmenten wurden deren Laufstrecken anhand der Photographie des jeweiligen Gels vermessen und zur Wanderstrecke von DNA-Fragmenten bekannter Größe in Relation gesetzt, die von der

Elektrophorese auf das jeweilige Gel mit aufgetragen wurden. Dies geschah über eine Eichkurve der bekannten Fragmente, die für jedes Gel neu zu erstellen war. Zur genaueren Berechnung wurden die jeweiligen Wanderungsstrecken mit Hilfe eines Densitometers vermessen, das anhand des betreffenden Polaroid-Negativs die Adsorption im sichtbaren Bereich über die gesamte Gelbahn bestimmt. Als Standard für die Berechnung der Molekulargewichte wurden die durch EcoRI-Einfach- bzw. EcoRI/Hind III-Doppelverdauung von λ -DNA erzeugten Fragmente verwendet, deren Molekulargewichte den Arbeiten von PHILLIPSEN et al. (P1), SZYBALSKI & SZYBALSKI (S25) und ROBINSON & LANDY (R4) entnommen wurden.

D. ERGEBNISSE

Die wirtskontrollierte Modifikation und Restriktion innerhalb des *Rhizobium-
Agrobacterium*-Systems wurde sowohl *in-vivo* als auch *in-vitro* analysiert. Stellvertretend für andere, bislang weniger gut untersuchte Teilsysteme wurden dazu neben *R.meliloti* und *A.tumefaciens* bevorzugt Bakterienstämme herangezogen, die durch Konversion oder Mutation aus einer dieser beiden Wildtypspecies hervorgegangen oder in sie umgewandelt worden waren. In einigen Fällen wurden Stämme verwendet, die zumindest in allen untersuchten Merkmalen mit einem der genannten Vertreter übereinstimmten. Innerhalb der Klasse II gelten die erhobenen Befunde strenggenommen nur für *R.meliloti*-Wildtypstämme. Zum Zeitpunkt dieser Arbeit waren keine echten Prowildtypstämme *per definitionem* (S1) für *R.meliloti* bekannt.

I. BIOCHEMISCHER NACHWEIS DER WIRTSKONTROLLIERTEN MODIFIKATION UND RESTRIKTION

Das Konzept zum *in-vitro*-Nachweis der Restriktions- und Modifikationssysteme der verschiedenen Klassen beinhaltete zum einen den Nachweis, die Isolierung und die Reinigung von Restriktionsenzymen aus repräsentativen Vertretern der einzelnen Klassen, zum anderen die Charakterisierung dieser Enzyme in Hinblick auf die Spaltung der aus Bakterien der verschiedenen Klassen präparierten Gesamt-DNA. Zum Nachweis der Restriktionsenzyme und zur Restriktionsanalyse wurde die Agarosegelelektrophorese nach SHARP et al. (S10) benutzt.

1. SCHNELLER NACHWEIS DER RESTRIKTIONSENZYME

Der Nachweis schnittspezifischer Restriktionsenzyme geschah in der in C.VI.1. (S.22) beschriebenen Weise mit Hilfe des aus den Zellen gewonnenen Rohlysats. Zum Test auf Restriktionsaktivität wurde der StrSO_4 -Überstand der untersuchten Bakterien, der sowohl gegen Puffer von pH 8,5 als auch von pH 7,5 dialysiert wurde, mit λ -, T7-, RP4- und PMB9-DNA unter den Bedingungen des BamHI-, Sma I-, Rlu-1 I-, Hind III- und EcoRI-Reaktionspuffers geprüft. Zusätzlich zu den bereits in der Diplomarbeit untersuchten Vertretern der Klasse IV (1-624, 1-99 und 1-56) wurde der StrSO_4 -Überstand der für ihre jeweilige Klasse repräsentativen Stämme 18-1 und 31-4 (Klasse I), 20-1 (Klasse II), 30-33 (Klasse III), 33-1, 1-37 und 29-1 (Klasse IV) untersucht, da zur gleichen Zeit auch wirtsspezifische Phagen für diese Stämme isoliert werden konnten. Mit 4-22 wurde weiterhin ein Vertreter der Klasse V, mit *R.leguminosarum* 300 (= 8-51) ein weiterer *Rhizobium*-Wildtyp in die Untersuchung mit einbezogen.

Bedingt durch starken, unspezifischen DNA-Abbau durch Exonukleasen (Schrieren im Gel) ließ sich keine Restriktionsaktivität im StrSO_4 -Überstand von 30-33 und 4-22 nachweisen. In allen anderen Fällen zeigte die Enzymprobe eindeutig Restriktionsaktivität mit λ - oder pMB9-DNA unter definierten Reaktionsbedingungen (nicht im Bild gezeigt). Die jeweils am besten geeigneten DNA-Substrate, Reaktions- und Dialysebedingungen sind aus Tab.11 ersichtlich. Im Agarosegel ließen sich die erzeugten Bandenmuster stets identisch reproduzieren, was beweist, daß es sich bei all diesen Aktivitäten um sequenzspezifisch spaltende Restriktionsendonukleasen handelte.

StrSO_4 -Überstand aus	pH des Dialysepuffers	Test-DNA	Reaktionspuffer
18-1	7,5	λ	Sma I-P.
31-4	7,5	pMB9	Rlu-1 I-P.
20-1	8,5	λ	Sma I-P.
33-1	8,5	pMB9	Rlu-1 I-P.
1-37	8,5	pMB9	Rlu-1 I-P.
29-1	8,5	λ	Sma I-P.
8-51	7,5	λ	Rlu-1 I-P.

Tab.11 Optimale Reaktionsbedingungen für Testspaltungen mit dialysiertem StrSO_4 -Überstand

Anhand der völlig übereinstimmenden Spaltmuster der pMB9-Verdauung konnte gezeigt werden, daß die Restriktionsaktivitäten aus 33-1 und 1-37 (Klasse IV) sowohl untereinander als auch mit denen der ebenfalls dieser Klasse angehörenden Stämme 1-624, 1-99 und 1-56 (Diplomarbeit) höchstwahrscheinlich identisch waren. Diese Aktivität konnte im Rahmen der Diplomarbeit als sequenzspezifisch spaltendes Restriktionsenzym Rlu-1 I gereinigt werden (W3). Dagegen wichen die Spaltmuster der enzymhaltigen Rohlysate aus 18-1, 31-4, 20-1, 29-1 und 8-51 signifikant voneinander und von der beschriebenen Rlu-1 I-Aktivität ab. Anhand der Verdauung von λ -DNA erwiesen sich die in den Stämmen 20-1 und 8-51 nachgewiesenen Restriktionsaktivitäten zudem als identisch mit den ebenfalls im Rahmen der Diplomarbeit gereinigten schnittspezifischen Restriktionsendonukleasen Rne I aus 20-1 bzw. Rle I aus 8-51 (W3). Die vom StrSO_4 -Überstand aus 31-4 bewirkte pMB9-Spaltung konnte durch Vergleich mit EcoRI-linearisierter pMB9-DNA als unvollständige Linearisierung des Plasmids beschrieben werden. Diese Feststellung war für den späteren Vergleich der innerhalb der Klasse I gereinigten Restriktionsenzyme von

nicht unerheblicher Bedeutung.

Trotz der im Rohlysate noch nicht abgetrennten Proteasen und unspezifischen Nukleasen erwies sich das angewandte Verfahren (außer für 30-33 und 4-22) als ausreichend für den schnellen und eindeutigen Nachweis von (Typ II-) Restriktionsenzymen in *Rhizobiaceen* und als wichtiger erster Schritt in Bezug auf die präparative Reinigung dieser Enzyme. Zum einen war erst nach mehr als einer Woche eine signifikante Abnahme in der Aktivität des StrSO_4 -Überstands bis hin zum Verlust festzustellen, zum anderen zeigten die untersuchten Rohlysate generell eine auf dieser Stufe der Isolierung bereits ungewöhnlich niedrige unspezifische DNase-Aktivität.

2. REINIGUNG DER RESTRIKTIONSENZYME

Aufbauend auf dem schnellen Nachweisverfahren wurde nunmehr die Vollreinigung der nachgewiesenen Restriktionsenzyme in Angriff genommen. Dazu wurden die Stämme 18-1, 31-4 (beide Klasse I), 33-1 und 29-1 (beide Klasse IV) ausgewählt. Mit Ene I aus 20-1 (Klasse II), Rlu-1 I aus 1-624 (Klasse IV) und Fle I aus 8-51 (*R. leguminosarum*-Wildtyp) standen darüberhinaus drei weitere, bereits gereinigte Restriktionsenzyme zum Vergleich zur Verfügung. Die Reinisolierung von Ene I und Rle I wird jedoch erstmals in der vorliegenden Arbeit beschrieben. Ferner wurde nochmals der Versuch unternommen, schnittspezifische Endonukleasen in den Stämmen 30-33 (Klasse III) und 4-22 (Klasse V), eventuell auf einer höheren Stufe der Reinigung, nachzuweisen. Die Durchführung der gesamten Reinigung erfolgte in der in C.VI.2. (S.22) beschriebenen Weise. Zum Test der während der verschiedenen Reinigungsschritte anfallenden Fraktionen, Grundvoraussetzung für die Weiterverarbeitung der jeweils aktiv(st)en Fraktionen, konnten die im Zuge des schnellen Nachweises ermittelten, aus Tab.11 (S.30) hervorgehenden Spaltbedingungen und DNA-Substrate übernommen werden. Die entsprechenden Inkubationsbedingungen sind der Tab.9 des Methodenteils (S.25) zu entnehmen.

2.1. Enzymreinigung unter TEMM-Puffer-Bedingungen

Als Konsequenz des erfolgreichen Einsatzes beim vorher beschriebenen Schnelltest wurde zunächst für alle Restriktionsenzyme TEMM-Puffer zum Suspendieren der Zellen und insbesondere als Dialyse- und Säulenpuffer während der gesamten Reinigung verwendet, dem (mit Ausnahme des Zellaufschlusses) 10 % (w/v) Glycerin zugesetzt wurden. Entsprechend dem jeweils besseren Ergebnis des Schnelltests (Tab.11 auf S.30) wurde der pH dabei entweder auf 8,5 (Stämme 20-1, 33-1 und 29-1) oder 7,5 (18-1, 31-4 und 8-51) eingestellt. Für die Stämme 30-33 und 4-22 wurde eine Pei-

nigung bei beiden pH-Werten versucht. Zellaufschluß und Gewinnung des enzymhaltigen Rohlysats erfolgten in der gleichen Weise und erbrachten dieselben Ergebnisse wie beim schnellen Nachweis.

2.1.1. Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Da Restriktionsendonukleasen in der Regel bei einer Sättigung der Enzymlösung zwischen 50 und 70% Ammoniumsulfat ausfallen (G7), wurde bei der nun folgenden $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung eine 50-, 70- und 100%ige Sättigung des Rohlysats realisiert. Beim anschließenden Test der Fraktionen zeigte sich, daß abgesehen von 30-33 und 4-22, wo aufgrund starker Exonukleaseaktivität erneut keine Restriktionsaktivität nachweisbar war, stets die Fraktion der mit 0-50 % Ammoniumsulfat ausgefällten Proteine die gesamte oder Hauptaktivität der gesuchten Restriktionsenzyme enthielt (nicht im Bild gezeigt). Zudem wies diese Aktivität weitgehende Übereinstimmung mit dem Spaltmuster des jeweiligen StrSO_4 -Überstands auf. Diese Fraktion wurde jeweils dialysiert und weiterverarbeitet. Im Fall von 30-33 und 4-22 wurden alle Fraktionen vereinigt und dialysiert.

2.1.2. Ionenaustauschchromatographie

Für die folgende Ionenaustauschchromatographie wurde, basierend auf den Erfahrungen der Diplomarbeit, die Trennung über Phospho- oder über DEAE-Cellulose vorangestellt, da häufig ein erheblicher Teil der unspezifischen Nukleasen nicht an die Phosphocellulose bindet und dadurch von vornherein abgetrennt wird (W3). Die Proteine wurden jeweils mit Hilfe eines linearen Gradienten von 0-1 M KCl (in Isolationspuffer) von den Austauschersäulen eluiert. Damit war sichergestellt, daß der Gradient diejenige Molarität einschloß, bei der das unbekannte Enzym jeweils desorbiert wurde, zumal die zur Elution der am festesten gebundenen Restriktionsenzyme in der Literatur angegebenen Salzkonzentrationen niemals 0,9 M KCl bzw. NaCl übersteigen (G7).

Im anschließenden Test der Fraktionen bewies das Fehlen jeglicher spezifischen Restriktionsaktivität im Durchlauf, daß die jeweiligen Restriktionsenzyme unter den angewandten Bedingungen vollständig an beide Austauscher gebunden wurden. Die einzige Ausnahme bildete das Enzym aus 20-1 (Rne I), das sich im Durchlauf der Phosphocellulose-Säule wiederfand (nicht im Bild gezeigt). In allen übrigen Fällen war nach erfolgreicher Trennung die Aktivität über eine begrenzte Anzahl von Fraktionen verteilt (ebenfalls nicht gezeigt). Die zugehörigen, zur Desorption der entsprechenden Enzyme von beiden Säulen benötigten KCl-Molaritäten sind in Tab.12 zusammengestellt.

Restriktionsenzym aus	Elution von der Phosphocellulose-Säule bei	Elution von der DEAE-Cellulose-Säule bei
18-1 (A)	0,04 - 0,33 M (T)	0,07 - 0,43 M (T)
18-1 (B)	0,15 - 0,40 M (P)	0,10 - 0,33 M (P)
31-4	0,06 - 0,34 M (T)	0,07 - 0,46 M (T)
31-4	0,03 - 0,36 M (P)	0,05 - 0,40 M (P)
20-1	Aktivität im Durchlauf (T)	0,12 - 0,36 M (T)
33-1	0,07 - 0,32 M (T)	0,19 - 0,28 M (T)
29-1 (A)	0,05 - 0,10 M (T)	0,10 - 0,20 M (T)
29-1 (B)	0,43 - 0,76 M (T)	0,23 - 0,25 M (T)
8-51	0,10 - 0,18 M (T)	0,08 - 0,25 M (T)

Tab.12 KCl-Bedingungen zur Elution der Enzyme von der Phospho- und DEAE-Cellulose-Säule

Die Abkürzungen T und P bedeuten Reinigung unter TEM- bzw. PC-Puffer-Bedingungen (im letzteren Fall kursiv gedruckt), A und B stehen für unterschiedliche Restriktionsaktivitäten

Beim Austesten der Phospho- und DEAE-Cellulose-Fractionen fielen mehrere Punkte ins Auge. So entwickelten die Phosphocellulose-Fractionen im Fall von 29-1 anhand der Spaltung von λ -DNA zwei unterschiedliche, durch eine Reihe inaktiver Fractionen voneinander getrennte Restriktionsaktivitäten (nicht gezeigt). Während hierbei das aufgrund der erzeugten Fragmente als erheblich aktiver einzuschätzende und bei einer wesentlich höheren KCl-Molarität von der Säule abgelöste Enzym jenes vom schnellen Nachweis her bekannte Restriktionsmuster zeigte, wurde eine vergleichsweise schwache Aktivität in mehreren frühen Fractionen des Eluats nachgewiesen. Um geeignetere Reaktionsbedingungen für dieses Enzym zu finden, wurde die λ -Verdauung außer unter Sma I- auch unter den Bedingungen des BamHI-, Rlu-1 I-, Hind III- und EcoRI-Reaktionspuffers untersucht. Dabei erwies sich definitiv Hind III-Puffer als günstigster Reaktionspuffer. Beide Enzyme aus 29-1 wurden über getrennte DEAE-Cellulose-Säulen weiter gereinigt. Die dort jeweils zur Elution notwendige KCl-Molarität ist in Tab.12 ebenfalls angegeben.

Außer bei 29-1 war dagegen bei keinem der untersuchten Stämme eine zweite Restriktionsaktivität auf dem Gelbild des jeweiligen Enzymtests zu erkennen, weder nach dem Phospho- noch nach dem DEAE-Cellulose-Schritt. Mit einer Ausnahme stimmten zudem die Spaltmuster aller im Verlauf der Ionenaustauschtrennung dar-

gestellten Enzyme mit denen des zugehörigen StrSO_4 -Überstands überein. Überraschenderweise traf dies nicht auf den Stamm 18-1 zu. In diesem Fall konnte keine λ -spezifische Aktivität von der Phosphocellulose-Säule eluiert werden, obwohl sich diese DNA-Sorte für den Test des StrSO_4 -Überstands als besonders geeignet erwiesen hatte. Wurde stattdessen pMB9-DNA zum Test derselben Fraktionen eingesetzt, konnte dafür eine pMB9-linearisierende Aktivität nachgewiesen werden, die mit dem von der Phosphocellulose-Säule abgelösten pMB9-spezifischen Restriktionsenzym völlig übereinstimmte und auch im selben KCl-Bereich wie diese von beiden Säulen eluierte (Tab.12).

Für die Stämme 30-33 und 4-22 konnte dagegen auch nach dem Phosphocellulose-Schritt keine (4-22) oder nur eine ganz schwache Restriktionsaktivität (30-33) nachgewiesen werden. In beiden Fällen wurde die Reinigung daher jeweils an dieser Stelle abgebrochen. Die aus 18-1, 31-4, 20-1, 33-1, 29-1 und 8-51 gereinigten Restriktionsenzyme wurden nach dem letzten Trennungsschritt (DEAE-Cellulose) in der in C.VI.2. (S.24) beschriebenen Weise eingeeingt.

2.2. Enzymreinigung unter PC-Puffer-Bedingungen

Aufgrund der beobachteten, lediglich inkompletten Linearisierung des pMB9-Plasmids war jedoch die Aktivität der aus 18-1 und 31-4 unter TEM-Puffer-Bedingungen gereinigten Restriktionsenzyme unbefriedigend, zum Teil sogar von der Aktivität des entsprechenden StrSO_4 -Überstands auffallend verschieden (18-1). Für diese Stämme und die Stämme 30-33 und 4-22 wurde daher die Reinigung unter PC-Puffer-Bedingungen wiederholt. Bei dieser Methode, die u.a., von leichten Variationen abgesehen, erfolgreich zur Reinigung der sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen *AtaBI* aus dem *A. tumefaciens*-Stamm B6 eingesetzt worden war (R5), wird der Aufschluß in TM-Puffer bei pH 7,5, die nachfolgende Reinigung dagegen statt in einem Tris- in einem phosphathaltigen Puffer (PC-Puffer) durchgeführt (E2). Ansonsten besteht kein grundsätzlicher Unterschied zur vorher verwendeten Methode.

Tatsächlich konnte unter diesen Bedingungen ein zweites Restriktionsenzym aus dem Stamm 18-1 gereinigt werden, wobei die nach beiden Ionenaustauschschritten demonstrierte Aktivität völlig mit der beim Test des StrSO_4 -Überstands aus 18-1 ursprünglich erhaltenen Restriktionsaktivität übereinstimmte. Aus den zur Elution benötigten KCl-Molaritäten (Tab.12) geht hervor, daß das unter PC-Puffer-Bedingungen gereinigte Enzym unter vergleichbaren Kriterien später vom jeweiligen Austauscher desorbiert wurde als das unter TEM-Puffer-Bedingungen isolierte. Im Einklang mit der unterschiedlich starken Bindung an die jeweilige Austauschersäule stehen auch die völlig abweichenden Spaltraster der unter beiden Bedingun-

gen aus 18-1 isolierten Enzyme.

Dagegen scheiterte der Versuch, mit Hilfe von TM- und PC-Puffer ein anderes, weiteres oder aktiveres Restriktionsenzym aus 31-4 zu isolieren. Analoges gilt für die Stämme 30-33 und 4-22, deren Enzymreinigung erneut nach dem Phosphocellulose-Schritt abgebrochen wurde. Alle weiteren, die Durchführung und Ergebnisse der zuletzt geschilderten Reinigungsmethode betreffenden Daten wurden bereits im Abschnitt "Reinigung unter TEMM-Puffer-Bedingungen" aufgeführt. Dies gilt auch für die Einengung des aus 18-1 isolierten Enzyms.

2.3. Benennung der gereinigten Restriktionsenzyme

Eine Benennung der gereinigten Endonukleasen konnte erst durchgeführt werden, nachdem durch Vergleich der Spaltmuster einschl. der notwendigen Doppelverdauungen sichergestellt war, welche Restriktionsenzyme eine neuartige DNA-Spezifität besaßen. Um jedoch das Verständnis der folgenden Kapitel zu erleichtern, wurde bereits an dieser Stelle die später vorgenommene Bezeichnung eingeführt.

Demnach wurden die aus 20-1, 18-1 (Enzym B), 31-4 (identisch mit Enzym A aus 18-1), 33-1 (identisch mit dem jeweiligen Enzym aus 1-37, 1-624, 1-99 und 1-56), 29-1 (Enzym A) und 8-51 gereinigten oder nachgewiesenen Enzyme mit Fne I, Atu-18 I, Atu-31 I (Min-Typ, Klasse I), Rlu-1 I (Car-Typ γ , Klasse IV), Atu-29 I (Car-Typ γ , Klasse IV) und Rle I bezeichnet. Enzym B aus 29-1 erhielt die Bezeichnung "Atu-29 II"-Aktivität (Car-Typ γ , Klasse IV).

Hierbei sei jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen, daß aufgrund der Fähigkeit des *Rhizobiaceen*-Wildtyps zur Umwandlung in eine der genannten Klassen die momentan für diese Bakterienfamilie gültige Artenbezeichnung neu überarbeitet werden muß. Die für die Benennung neuisolierter Restriktionsenzyme vorgeschlagenen, international anerkannten Nomenklaturregeln (A8,S16) lassen sich zur Zeit nicht mit dem hier vorgestellten System von Klassen in Einklang bringen. Die vorstehende Bezeichnung für die aus repräsentativen Vertretern dieser Klassen gereinigten Restriktionsenzyme sind daher nur als Notbehelf zu verstehen.

3. CHARAKTERISIERUNG DER GEREINIGTEN RESTRIKTIONSENZYME

3.1. Bedingungen der Enzymreaktion

3.1.1. DNA-Substrate, Enzymmengen und Inkubationsbedingungen

Zur Ermittlung der optimalen Reaktionsbedingungen konnte auf die zum Enzymtest während der Reinigung jeweils verwendeten DNA-Proben zurückgegriffen werden. Im Fall von Atu-31 I erwies sich die bisher verwendete Test-DNA (pMB9) aller-

dings hierfür als nicht sonderlich geeignet, da sie von Atu-31 I lediglich linearisiert wurde. Mit der DNA des Phagen $\phi 33$ konnte ein für diesen Zweck wesentlich besser geeignetes DNA-Substrat gefunden werden. Zur Ermittlung der optimalen Enzymkonzentration für Spaltungen wurden steigende Volumina der jeweiligen Enzympräparation (3, 5, 10 und 20 μ l) unter den Bedingungen des zuletzt während der Reinigung verwendeten Reaktionspuffers (Tab.11 auf S.30) ausgetestet. Die niedrigste Enzymkonzentration, die in der Verdünnungsreihe bereits das vollständige Spaltnmuster erbrachte, wurde als geeignete Enzymkonzentration angesehen und ist in Tab.13 angegeben. Durch unterschiedlich lange Verdauung (1, 2 und 4 Std.) der Proben bei Raumtemperatur, 30°C und 37°C wurden gleichzeitig die für jedes Enzym optimalen Inkubationsbedingungen ermittelt, die, wie aus Tab.13 hervorgeht, in allen Fällen 1 Std. bei 37°C betrug.

Restriktions- enzym	Enzymmenge	Reaktionsansatz				Inkubations- bedingungen
		pH	Tris (mM)	MgCl ₂ (mM) ²	NaCl/KCl (mM)	
<u>Atu-18 I</u>	10 μ l	7,5	15	6	20 KCl	1 Std. 37°C
<u>Atu-31 I</u>	3 μ l	9	12	6	-	"
<u>Pme I</u>	10 μ l	8,5	15	6	15 KCl	"
<u>Rlu-1 I</u>	5 μ l	9	12	6	-	"
<u>Atu-29 I</u>	5 μ l	8,5	10	10	75 NaCl	"
" <u>Atu-29 II</u> "- aktivität	5 μ l	8,5	15	6	20 KCl	"
<u>Rle I</u>	5 μ l	9	12	6	-	"

Tab.13 Optimale Reaktionsbedingungen für Spaltungen mit den gereinigten Restriktionsenzymen

3.1.2. Ermittlung des optimalen Reaktionsansatzes

Zur Ermittlung des jeweils optimalen Reaktionsansatzes wurde die Auswirkung unterschiedlicher pH- und Ionenbedingungen auf die Vollständigkeit der untersuchten DNA-Spaltung beobachtet. Dabei wurde ausgehend von dem während der Reinigung verwendeten günstigsten Reaktionspuffer (Tab.11 auf S.30) die pH- und Ionenabhängigkeit der Enzymreaktion durch Variation des pH-Wertes von 6,5 bis 10 und der Salzkonzentration von 0 bis 150 mM KCl bestimmt. Dagegen wurde die Tris- und MgCl₂-Konzentration des Originalpuffers beibehalten, da erfahrungsgemäß die jeweiligen Restriktionsmuster über einen breiten Tris- und MgCl₂-Be-

reich unverändert bleiben, sofern eine bestimmte Mindestkonzentration eingehalten wird (R2). Als solche wurde eine Tris/HCl-Konzentration von 10 mM und eine MgCl-Konzentration von 6 mM angesehen. Für die Spaltungen wurden die im vorherigen Abschnitt ermittelten optimalen Enzymmengen und Inkubationsbedingungen eingesetzt. Zusammensetzung und pH des jeweils optimalen, d. h. die vollständigste Spaltung bewirkenden Reaktionspuffers sind ebenfalls in Tab.13 zusammengefaßt. Diese Bedingungen wurden für alle weiteren zur Charakterisierung der gereinigten Enzyme durchgeführten Spaltungen, von wenigen Ausnahmen abgesehen, strikt eingehalten.

Bei den angestellten Untersuchungen fiel ein Sachverhalt auf, der für die weitere Charakterisierung der Restriktionsenzyme aus dem Stamm 29-1 von grundlegender Bedeutung war. Unter den für das Enzym A (Tab.12 auf S.33) optimalen Reaktionsbedingungen (75 mM NaCl bzw. KCl im Reaktionsansatz) wurde das zunächst wesentlich aktivere Enzym B (Tab.12) so stark inhibiert, daß nunmehr die Spaltnuster beider Enzyme, auch nach Molekulargewichtsbestimmung der Fragmente, völlig übereinstimmten (nicht im Bild gezeigt). Dieses Phänomen wurde in Abschnitt 3.2. näher untersucht.

3.2. DNA-Spezifität der gereinigten Restriktionsenzyme

3.2.1. Spaltung von nichtmodifizierter Plasmid- und Viren-DNA

In diesem Abschnitt wurde die Restriktion der Plasmide pMB9 und RP4 (beide aus *E. coli*) sowie der DNA der *E.coli*-spezifischen Phagen λ und T7 durch die gereinigten Restriktionsenzyme untersucht. Soweit verfügbar (und angegeben) wurden auch das Plasmid pBR322 (aus *E.coli*) sowie DNA aus Adenovirus-2 und den Phagen T5 (*E.coli*) bzw. P22 (*S.typhimurium*) zur Charakterisierung einzelner Restriktionsenzyme eingesetzt. Zur Charakterisierung von Atu-31 I wurde zusätzlich die DNA des für die Stämme der Klasse IV spezifischen Phagen ϕ 33 herangezogen. Eine genauere Untersuchung der DNA-Spezifität von Atu-29 I wurde aus den im Abschnitt 3.2.3. (S.40) genannten Gründen nicht durchgeführt. Alle Verdauungen erfolgten unter den in Tab.13 (S.36) angegebenen optimalen Reaktionsbedingungen. Tab.14 gibt die Anzahl der entstandenen DNA-Fragmente an. Aufgrund der häufig inkompletten Spaltungen wurde dabei in der Regel auf eine Umrechnung in die zugehörige Anzahl von Schnittstellen verzichtet. Einen Ausschnitt der entsprechenden Spaltnuster geben die Abbildungen 2 bis 4 wider. Die jeweiligen Elektrophoresebedingungen können den Legenden der einzelnen Abbildungen entnommen werden.

LNA-Substrat	Zugehörige Abbildung	<u>Atu-18</u> I	<u>Atu-31</u> I	<u>Pae</u> I	<u>Rlu-1</u> I	" <u>Atu-29</u> II"-Aktivität	<u>Ple</u> I
λ	3	> 10*	2*	2*	3**	> 10*	> 10*
T7	-	8	-	-	-	3	> 10
T5	-	n.u.	n.u.	6	3	> 10	> 10
P22	-	n.u.	n.u.	9	4	n.u.	> 10
Adenovirus-2	4	n.u.	n.u.	> 10*	14**	n.u.	> 10*
pMB9	2	4	1*	-*	12 (5)*	> 10*	1
pBR322	4	n.u.	n.u.	-	8 (4)*	> 10*	1
RP4	-	> 10	-	5	> 10	> 10	> 10
ϕ 33	-	n.u.	10	n.u.	n.u.	-	n.u.

Tab.14 DNA-Spezifität der gereinigten Restriktionsenzyme

In den einzelnen Spalten ist die jeweilige Anzahl der im Agarosegel erzeugten Fragmente angegeben. Die mit * oder ** hervorgehobenen Zahlen beziehen sich auf die Abbildungen 2 bis 4 im Anhang dieser Arbeit. Soweit bekannt (S11), wurde für Rlu-1 I die Anzahl der bei vollständiger Spaltung resultierenden Fragmente in Klammern ergänzt. Die mit ** bezeichneten Werte gelten für die zu Rlu-1 I isoschizomeren Restriktionsenzyme Nae I und Nru I und wurden der Liste von ROBERTS (R3) entnommen. n.u. bedeutet nicht untersucht.

Während Spaltungen mit der "Atu-29 II"-Aktivität (außer bei T7-DNA) ebenso wie Rle I-Verdauungen (abgesehen von pMB9 und pBR322) im allgemeinen zu einer starken DNA-Fragmentierung führten, lieferte die Spaltung der jeweiligen DNA-Species in den übrigen Fällen, ausgenommen die Rlu-1 I-Spaltung von RP4- und Adenovirus-2-DNA sowie die RP4- und λ -Verdauung durch Atu-18 I, eine begrenzte Anzahl linearer Fragmente, deren Molekulargewichte anhand von λ -Standardfragmenten bekannter Größe

ermittelt wurden (siehe C.VI.4. auf S.27). Allerdings blieben die Verdauungen, auch bei 4-stündiger Inkubation oder bei Zusatz von Restriktionsenzym im Überschuß häufig inkomplett. Entweder wurde nur ein Teil der eingesetzten DNA gespalten, oder die Summe der für die einzelnen Fragmente errechneten Längen überstieg das Molekulargewicht der ungespaltenen Gesamt-DNA. Im Fall der reinen Rle I-Verdauungen sowie der Rlu-1 I-Spaltung von RP4- und Adenovirus-2-DNA (jeweils sehr starke Fragmentierungen) erscheinen jedoch Komplettspaltungen möglich, da hier jeweils das größte entstandene Fragment sehr weit unterhalb der ungespaltenen DNA-Kontrolle bandierte.

3.2.2. Spezifität der gereinigten Restriktionsenzyme im Vergleich

In diesem Abschnitt wurde die Frage beantwortet, ob die verschiedenen gereinig-

ten Restriktionsenzyme untereinander identisch oder von unterschiedlicher IMA-Spezifität waren. Dazu wurde zunächst dort, wo bei Spaltung derselben DNA-Prote scheinbar identische Restriktionsmuster auftraten und Anzahl sowie Verteilung der zugehörigen DNA-Banden dies ermöglichten, eine Molekulargewichtsbestimmung der Fragmente durchgeführt. Dies war der Fall beim Vergleich zwischen Rlu-1 I (aus 1-624) und dem aus 33-1 gereinigten Restriktionsenzym anhand der Verdauung von pMB9-DNA (Abb.2). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in der Größe der verglichenen Fragmente festgestellt werden (nicht gezeigt). Zum endgültigen Nachweis ihrer Identität wurde eine Doppelverdauung mit den beiden Enzymen durchgeführt. Dabei erwiesen sich die Restriktionsenzyme aus 33-1 und 1-624 (Rlu-1 I) endgültig als völlig identisch (Abb.2).

Weiterhin erfolgten Doppelverdauungen in allen Fällen, in denen die beiden Restriktionsenzyme entweder aus dem gleichen Stamm oder derselben Klasse isoliert worden waren. Neben den beiden aus 29-1 gereinigten Enzymaktivitäten (siehe den folgenden Abschnitt 2.3.2.) wurden dabei insbesondere die beiden unterschiedlichen Endonukleasen aus 18-1 und 31-4 miteinander verglichen. Ferner wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den aus 33-1 (bzw. 1-624) und 29-1 gereinigten Enzymen bestand. Unter jeweils optimalen Bedingungen erbrachte die Doppelverdauung von Ø33-DNA mit den unterschiedlichen Enzymaktivitäten aus 18-1 und 31-4 dabei ein gegenüber beiden Einzelspaltungen neuartiges Restriktionsmuster (nicht im Bild gezeigt). Dies gilt in gleichem Maß für die Doppelverdauung von λ -DNA mit Rlu-1 I und den Enzymen A bzw. B aus 29-1 (ebenfalls nicht gezeigt), so daß in beiden Fällen die beteiligten Enzyme als untereinander verschieden gelten müssen. In allen weiteren Fällen erübrigte sich eine Doppelverdauung, da, bezogen auf dieselbe DNA-Species (sofern gespalten), weder die Restriktionsmuster noch, soweit möglich, die daraus ermittelten Fragmentgrößen miteinander in Einklang zu bringen waren. Somit konnten aus den untersuchten *Rhizobiaceen* insgesamt sieben verschiedene sequenzspezifische Enzymaktivitäten gereinigt werden, die in der in 2.3. (S.35) bereits vorweggenommenen Weise benannt wurden.

Auf eine Bestimmung der Erkennungssequenz und Schnittstelle der gereinigten Restriktionsenzyme wurde verzichtet. Ebenso wurde ein Vergleich mit den Spaltmustern anderer, zum Zeitpunkt der Reinigung bereits veröffentlichter Restriktionsenzyme nur für die drei zuerst gereinigten Endonukleasen Rlu-1 I, Rme I und Rle I durchgeführt. Dabei zeigte keines der drei Enzyme Ähnlichkeit mit bereits bekannten Restriktionsenzymen (R. ROBERTS, pers.Mitteilung), was im Fall von Rlu-1 I durch die Bestimmung einer bis dahin völlig neuartigen Erkennungssequenz (5' G C C G G C 3') bestätigt wurde (R7). In der Zwischenzeit konnten aus *Neisseria* und *Nocardia* zwei zu Rlu-1 I isoschizomere Restriktionsendonukleasen isoliert werden (C8,V4).

3.2.3. DNA-Spezifität der beiden Enzymaktivitäten aus 29-1

Um zu klären, inwieweit die beiden aus 29-1 gereinigten Restriktionsenzyme miteinander in Beziehung standen bzw. aufgrund der in 3.1. (S.37) erhobenen Befunde sogar identisch waren, wurde eine Doppelverdauung mit beiden Enzymen durchgeführt. Dazu wurde λ -DNA eingesetzt, wobei zweierlei Reaktionsbedingungen angewendet wurden. Zunächst wurde jede Einzelspaltung unter den für das jeweilige Enzym optimalen (Standard-)Bedingungen (Tab.13 auf S.36) durchgeführt (Abb.5). Überraschenderweise war dabei das resultierende Restriktionsmuster der Doppelverdauung nicht von der einfachen Spaltung mit dem später als "Atu-29 II"-Aktivität bezeichneten, aktiveren Enzym B zu unterscheiden. Weder traten neue Fragmente auf, noch verschwanden alte. Wurde dagegen jede Einzelspaltung unter den für Enzym A (später Atu-29 I genannt) optimalen (für B inhibierenden) Bedingungen mit 75 mM Salz im Reaktionsansatz durchgeführt, war umgekehrt die Doppelverdauung vollkommen identisch mit der Einzelverdauung durch Enzym A (ebenfalls Abb.5). Damit war sichergestellt, daß das Enzym A in der Aktivität von B enthalten sein mußte, entweder in einer aktiveren Form oder zusammen mit einem weiteren Restriktionsenzym. Aus diesem Grund erhielt Enzym B die Bezeichnung "Atu-29 II"-Aktivität.

Zur weiteren Charakterisierung der Spezifität der beiden isolierten Aktivitäten wurde eine Vielzahl verschiedener DNA-Substrate mit Atu-29 I und der "Atu-29 II"-Aktivität verdaut. Neben den in 3.2.1. genannten DNA-Sorten wurde dazu u.a. auch die DNA der für die verschiedenen Klassen des *R.meliloti*-*A.tumefaciens*-Systems spezifischen Phagen (ϕ 18, ϕ 31, ϕ 20, ϕ 30, ϕ 33, ϕ 1 und ϕ 29) herangezogen. Alle Verdauungen erfolgten sowohl unter Atu-29 I- als auch unter "Atu-29 II"-Standardbedingungen (Tab.13 auf S.36). In Hinblick auf die mögliche Existenz zweier verschiedener Restriktionsenzyme im Stamm 29-1 wurde insbesondere nach DNA-Substraten gesucht, die beim Vergleich der Atu-29 I- und "Atu-29 II"-Verdauung unter bestimmten Bedingungen nur von einem der beiden hypothetischen Enzyme gespalten wurden. Dies war jedoch trotz ausreichender Zahl untersuchter DNA-Proben nicht der Fall, was für das Vorhandensein von lediglich zwei verschieden aktiven Formen desselben Restriktionsenzym spricht. Eine Bestimmung der Erkennungssequenz, die eine endgültige Klärung dieser Problemstellung bedeutet hätte, wurde nicht durchgeführt.

3.3. DNA-Modifikation der untersuchten Rhizobiaceen-Stämme

Zur *in-vitro* Charakterisierung der R/M-Systeme der einzelnen Klassen wurde die Gesamt-DNA aus den in Tab.15 angegebenen Bakterienstämmen mit den gereinigten Restriktionsenzymen Atu-18 I (aus 18-1), Atu-31 I (aus 31-4), Rne I (aus 20-1)

Rlu-1 I (aus 33-1), Rle I (aus 8-51) und der "Atu-29 II"-Aktivität (aus 29-1) verdaut. Zum weiteren Verständnis der Modifikationssysteme der Klasse I wurde zusätzlich die DNA der für diese Klasse spezifischen Phagen Ø18 (aus 18-1), Ø18/31 (Ø18 vermehrt auf und isoliert aus 31-4) und Ø31 (aus 31-4) mit den beiden aus 18-1 (Atu-18 I) und 31-4 (Atu-31 I) dargestellten Restriktionsenzymen behandelt.

		Klasse					
		I		II	IV		
		<u>Atu-18 I</u>	<u>Atu-31 I</u>	<u>Rne I</u>	<u>Rlu-1 I</u>	" <u>Atu-29 II</u> "-aktivität	<u>Rle I</u>
Klasse I	18-1	-	-	+	+	+	+
	18-18	-	-	+	+	+	+
	18-23	-	-	+	+	+	+
	18-30	-	-	+	+	+	+
	31-1	+	-	+	+	+	+
	31-4	+	-	+	+	+	+
	31-12	+	-	+	+	+	+
	31-22	+	-	+	+	+	+
	31-25	+	-	+	+	+	+
Klasse II	MV II/1	+	+	⊕	+	+	+
	20-23	+	+	⊕	+	+	+
	20-50	+	+	⊕	+	+	+
	20-1	+	+	-	+	+	+
	20-43	+	+	-	+	+	+
	20-45	+	+	-	+	+	+
	20-46	+	+	-	+	+	+
	20-47	+	+	-	+	+	+
	20-48	+	+	-	+	+	+
	20-49	+	+	-	+	+	+
	32-3	+	+	-	+	+	+

Tab. 15 Nachweis der DNA-Modifikation durch Spaltung von Gesamt-DNA mit den gereinigten Restriktionsenzymen

+ gespalten - nicht gespalten

(Fortsetzung Tab. 15)

		Klasse					
		I		II	IV		
		<u>Atu-18 I</u>	<u>Atu-31 I</u>	<u>Rme I</u>	<u>Rlu-1 I</u>	<u>"Atu-29 II"- aktivität</u>	<u>Rle I</u>
Klasse III	30-6	+	+	+	+	+	+
	30-14	+	+	+	+	+	+
	30-18	+	+	+	+	+	+
	30-25	+	+	+	+	+	+
	30-30	+	+	+	+	+	+
	30-32	+	+	+	+	+	+
	30-33	+	+	+	+	+	+
	30-34	+	+	+	+	+	+
	30-36	+	+	+	+	+	+
Klasse IV	33-1	+	+	+	-	⊕	+
	33-2	+	+	+	-	⊕	+
	1-37	+	+	+	-	⊕	+
	1-42	+	+	+	-	⊕	+
	1-56	+	+	+	-	⊕	+
	1-99	+	+	+	-	⊕	+
	1-624	+	+	+	-	⊕	+
	1-932	+	+	+	-	⊕	+
	29-1	+	+	+	⊕	-	+
	26-1	+	+	+	⊕	⊕	+
Klasse V	4-20	+	+	+	+	+	+
	4-22	+	+	+	+	+	+
	4-23	+	+	+	+	+	+
	4-27	+	+	+	+	+	+
	4-30	+	+	+	+	+	+
	4-31	+	+	+	+	+	+
	4-33	+	+	+	+	+	+

Tab. 15 Nachweis der DNA-Modifikation durch Spaltung von Gesamt-DNA mit den gereinigten Restriktionsenzymen (Fortsetzung)

+ gespalten

- nicht gespalten

Alle Verdauungen erfolgten unter den in Tab.13 (S.36) angegebenen optimalen Reaktionsbedingungen, wobei Reaktionsansätze mit bakterieller DNA jeweils 2 Std. inkubiert wurden. Die Ergebnisse der Gesamt-DNA-Spaltungen sind, nach "+" (Spaltung) oder "-" (keine Spaltung) aufgeschlüsselt, in Tab.15 zusammengefaßt. Einen Querschnitt durch die jeweiligen Gelbilder zeigen die Abbildungen 6 bis 13 (Gesamt-DNA) und 14 (Phagen-DNA). Die Elektrophoresebedingungen sind den Legenden der einzelnen Abbildungen zu entnehmen.

Wie aus Tab.15 und der jeweils zugehörigen Abbildung hervorgeht, wurde dabei in keinem Fall die DNA des enzymproduzierenden Stammes (siehe oben) vom zelleigenen Restriktionsenzym *in-vitro* gespalten. Zudem wurde weder die DNA aus den (außer 33-1) ebenfalls nachweislich Rlu-1 I produzierenden Stämmen 1-624, 1-99, 1-56 und 1-37 von Rlu-1 I angegriffen (Abb.10) noch die DNA des Phagen Ø18 durch Atu-18 I (Abb.14) oder die DNA der Phagen Ø18/31 und Ø31 durch Atu-31 I (Abb.14). Diese Ergebnisse beweisen, daß alle gereinigten Restriktionsenzyme Teil eines bakteriellen R/M-Systems der betreffenden Bakterienstämme sein müssen. Darüberhinaus erwiesen sich mit Ausnahme der DNA aus 29-1 und 26-1 (Abb.10) sämtliche innerhalb der Klasse IV getesteten DNA's als resistent gegen Rlu-1 I aus 33-1 (Abb.10). Analog dazu griff innerhalb der Klasse II Rne I (aus 20-1) nur ganz ausnahmsweise DNA aus anderen *R.meliloti*-Wildtypstämmen an (MV II/1, 20-23 und 20-50), während die DNA der überwältigenden Mehrheit der untersuchten *R.meliloti*-Wildtypstämme ungespalten blieb (Abb.8). Bei MV II/1, 20-23 und 20-50 handelt es sich jedoch um Bakterien, die entweder selbst oder deren Ausgangsstämme eine von den übrigen untersuchten *R.meliloti*-Wildtypstämmen abweichende geographische Herkunft aufweisen. Weiterhin wurde im Fall von Atu-31 I aus 31-4 weder die DNA eines anderen Minimaltyp-Vertreters der Klasse I angegriffen noch die DNA aus einem der dieser Klasse unmittelbar angeschlossenen *A.tumefaciens*-Wildtypstämmen. Auch hinsichtlich des Restriktionsenzym Atu-18 I aus 18-1 wurde keinerlei DNA aus den verwendeten *A.tumefaciens*-Stämmen gespalten (Abb.6).

In allen übrigen Fällen kam es zu einer Fragmentierung der jeweiligen DNA-Probe. Dies betraf, abgesehen von den bereits genannten Beispielen (29-1 und 26-1 mit Rlu-1 I, MV II/1, 20-23 und 20-50 mit Rne I), insbesondere die Verdauung sämtlicher aus Vertretern der Klasse IV (ausgenommen 29-1) isolierten DNA-Species, einschl. DNA aus 26-1, durch die "Atu-29 II"-Aktivität (Abb.12) sowie innerhalb der Klasse I die Spaltung jedweder DNA aus Minimaltypstämmen durch Atu-18 I aus 18-1 (Abb.6). Ferner wurden alle DNA's der Klassen III und V sowie alle mit Rle I verdauten DNA-Proben in eine Vielzahl von Fragmenten abgebaut (Abb.7, 9, 11 und 13). Aufgrund des zuletzt genannten Ergebnisses ist festzuhalten, daß mit Ausnahme des enzymproduzierenden Stammes (8-51) offensichtlich keiner der unter-

suchten Stämme die für Rle I-Resistenz spezifische Methylierung trug.

Einen Sonderfall stellte zunächst die aus Minimaltyp und *Agrobacterium*-Wildtyp bestehende Gruppierung (Klasse I) dar. Während Minimaltyp-DNA von Atu-18 I aus 18-1 nachweislich fragmentiert wurde (Abb.6), wurde umgekehrt *A. tumefaciens*-DNA von Atu-31 I (aus dem Stamm 31-4) nicht gespalten. Diese Ergebnisse standen in gewissem Gegensatz zu der Tatsache, daß unter TENM-Puffer-Bedingungen dasselbe Restriktionsenzym (Atu-31 I) aus 18-1 und 31-4 gereinigt werden konnte (siehe D.I.2. auf S.34) und deutete auf einen unterschiedlichen Gehalt an Restriktionsenzymen, aber teilweiser Übereinstimmung der DNA-Modifikation bzw. R/M-Systeme beider Stämme hin. Diese Vermutung konnte durch Verdauung der DNA des Phagen Ø18/31 - die Vermehrung von Ø18 auf 31-4 führt lediglich zur Ausprägung der für 31-4 typischen DNA-Methylierung - weiter verifiziert werden. Die erfolgreiche Spaltung von Ø18/31-DNA mit Atu-18 I (Abb.14) demonstriert, daß diese Restriktion tatsächlich nur auf der nunmehr veränderten DNA-Modifikation des Phagen beruht bzw., daß das unterschiedliche Restriktions- und Modifikationsverhalten von *A. tumefaciens*- und Minimaltypstämmen *in-vitro* alleine auf die unterschiedliche Ausstattung mit R/M-Systemen zurückzuführen ist.

Was die Klassen I, II und IV anbelangt, so ergaben sich aus den in diesem Abschnitt erhobenen Befunden somit bereits deutliche Hinweise darauf, daß von seltenen Ausnahmen abgesehen, alle Stämme einer Klasse dasselbe und von den Stämmen anderer Klassen verschiedene Modifikationssystem besitzen, wobei innerhalb der Klasse I *A. tumefaciens*-Wildtypstämme höchstwahrscheinlich durch mindestens ein weiteres R/M-System charakterisiert sind. Ob dagegen auch die Klassen III und V durch den Besitz eines klassenspezifischen R/M-Systems ausgezeichnet sind, läßt sich ohne Kenntnis der Wirtsspezifität der isolierten Phagen (D.II.) alleine aus der Tatsache, daß sämtliche DNA's dieser Stämme von allen sechs gereinigten Restriktionsenzymen gespalten wurden, nicht zwanglos folgern. Allerdings liefert im Fall des Stammes 30-33 der Nachweis einer sehr schwachen Restriktionsaktivität im Verlauf mehrerer Reinigungsversuche dafür gewisse Hinweise.

Ergänzend bleibt festzuhalten, daß nach erfolgreicher Spaltung in eine Vielzahl von Fragmenten eine große Zahl definierter Banden im jeweiligen Spaltmuster erkennbar wurde. Anhand dieser definierten Banden ließ sich eine weitgehende Übereinstimmung im Restriktionsmuster aller identisch modifizierten DNA-Species feststellen, sofern dasselbe Restriktionsenzym verwendet wurde, während die Spaltmuster der Vertreter unterschiedlicher Klassen keine große Ähnlichkeit aufwiesen. Gewisse Unterschiede zeigten sich auch beim Vergleich von Minimaltyp- mit *A. tumefaciens*-Wildtypstämmen, die sich bekanntlich durch den Besitz eines funktionellen Ti-Plasmids unterscheiden (B4).

II. BIOLOGISCHER NACHWEIS DER WIRTSKONTROLLIERTEN MODIFIKATION UND RESTRIKTION

Zum biologischen Nachweis der Restriktions-/Modifikationssysteme wurde die Wirtsspezifität der für die einzelnen Klassen isolierten lytischen Bakteriophagen nach dem klassischen Schema von ARBER (A 5) sowohl qualitativ als auch quantitativ analysiert. Das Konzept zur Aufklärung der R/M-Systeme *in-vivo* beinhaltet daher sowohl die Isolierung, Reinigung und Anreicherung wirtsspezifischer Phagen für die einzelnen Klassen als auch deren Charakterisierung in Hinblick auf ihre Vermehrung in Wirten aus anderen Klassen. Die Untersuchungen zur Wirtsspezifität der Phagen erfolgten mit Hilfe der Weichagarguismethode nach ADAMS (A 1).

1. ISOLIERUNG WIRTSSPEZIFISCHER BAKTERIOPHAGEN

Die zur biologischen Untersuchung der R/M-Systeme eingesetzten Phagen wurden sämtlich aus Komposterde angereichert. Bereits 1980 konnten RÖSCH et al. durch Modifikation der klassischen Methode von ADAMS (A 1) für drei der fünf Klassen des *Rhizobiaceen*-Systems wirtsspezifische Bakteriophagen isolieren (F 7). Die verwendete Bodenprobe stammte dabei in allen Fällen aus dem Leguminosenbeet der Systemanlage des Botanischen Gartens in Erlangen. Als Wirte verwendeten die Autoren die Stämme 18-1, 31-4 (beide Klasse I), 20-1, 32-3 (beide Klasse II), 33-1, 1-37 und 29-1 (alle Klasse IV). Entsprechend ihrer Herkunft wurden die gewonnenen Phagen mit ϕ 18-1, ϕ 31-4, ϕ 20-1, ϕ 32-3, ϕ 33-1, ϕ 1-37 und ϕ 29-1 bezeichnet. Unabhängig voneinander isolierte Phagen wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung durchnummeriert, also z. B. ϕ 18-1-3. Durch Vergleich der Morphologie der Phagen und ihrer Hemmhöfe und durch physikalische Charakterisierung ihrer Nukleinsäure wurde durch TRAEG (1982) sichergestellt, daß alle genannten Phagen, obwohl gleichzeitig aus derselben Erdprobe isoliert, eindeutig voneinander verschieden waren (T 3).

Trotz intensiver Suche ließen sich zunächst keine wirtsspezifischen Phagen für die Klassen III und V des *Rhizobiaceen*-Systems isolieren. Ein Teilziel der vorliegenden Arbeit bestand daher in der Anreicherung solcher Phagen. Wie schon von RÖSCH et al. wurden dazu wiederum Bodenproben der verschiedensten Herkunft untersucht, darunter neben Erde aus der unmittelbaren Umgebung von Leguminosenwurzeln erneut auch Komposterde aus dem Leguminosenbeet des Botanischen Gartens. Als Wirte wurden die Stämme 30-18, 30-30 und 30-33 (für die Klasse III) bzw. 4-20 und 4-22 (für die Klasse V) ausgewählt. Die genaue Durchführung der Isolierung, Reinigung und Anreicherung der Phagen ist in Abschnitt C.V. (S.16 ff.) beschrieben. Als wesentliche Neuerung wurden dabei in Abweichung von klassischen Isolierungsmethoden die möglicherweise im Isolat

vorhandenen Phagen vor dem Tropftest zunächst konzentriert. Dazu wurde im Anschluß an die niedertourige Sedimentation des Filtrats der Überstand erst hochtourig zentrifugiert und der erhaltene Niederschlag in einem möglichst geringen Puffervolumen resuspendiert.

Mit der verbesserten Methode ließen sich tatsächlich plaqueähnliche Hemmhöfe im Indikatorrasen von 30-33 und 4-22 nachweisen, die allesamt erneut durch Isolate aus dem Leguminosenbeet des Botanischen Gartens in Erlangen erzeugt wurden. Während jedoch im Fall von 4-22 die Hemmung bereits nach 16 Std. zu erkennen war, traten die ersten Hemmhöfe bei 30-33 erst nach 30- bis 40stündiger Bebrütung der Platten auf. Soweit es sich um 30-33 handelte, erfüllte sämtliches aus den ursprünglich erzeugten Hemmhöfen isoliertes Material uneingeschränkt die für das Vorliegen von Phagen geforderten Bedingungen (Vermehrung durch Auftropfen, Bildung einer der jeweiligen Verdünnungsstufe entsprechenden Zahl von Einzelplaques). Insgesamt wurden mit 30-33 als Wirt unabhängig voneinander acht Phagenlysate gereinigt, die mit Ø30-33-1 bis Ø30-33-8 bezeichnet wurden. Dagegen ließ sich das aus 4-22 isolierte Material weder über eine Verdünnungsreihe zu Einzelplaques ausgießen noch durch Auftropfen anreichern. Vielmehr waren nach diesen beiden Schritten keinerlei Plaques oder Hemmhöfe mehr nachweisbar, weshalb in diesem Fall Phagenaktivität als Ursache der Hemmhöfe auszuschließen war.

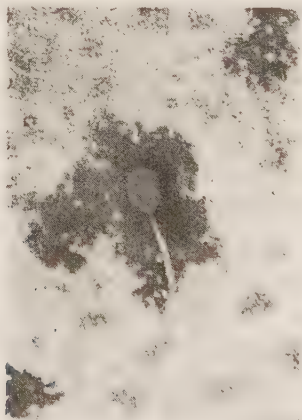


Abb.15 Elektronenoptische Aufnahme von Ø30-33-3 (100 000-fache Vergrößerung)

Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Dr. Rösch, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

Die ausführliche Charakterisierung der isolierten Phagen wird in einer späteren Arbeit beschrieben. Aufgrund der von RÖSCH durchgeführten Voruntersuchungen lassen sich jedoch bereits erste Aussagen über das in dieser Dissertation verwendete Lysat von Ø30-33-3 machen (A.RÖSCH, pers.Mitteilung). Demnach handelt es sich hierbei um einen λ -ähnlichen Phagen (Gruppe II des BRADLEY-Schemas) mit ikosaedrischem Kopf und langgestrecktem, helikal aufgebauten Schwanz ohne erkennbare Basisstrukturen (Abb.15). Groben Schätzungen zufolge besitzt die im Phagenkopf enthaltene lineare, doppelsträngige DNA ein Molekulargewicht in der Größenordnung von λ -DNA (ca. 30 Md). Die Reifungsperiode des Phagen scheint, wie sich schon nach dem Austesten des aus der Komposterde gewonnenen Isolats abzeichnete, erheblich länger als bei den von RÖSCH et al. isolierten Phagen. Erste Plaques treten frühestens nach 30 Std. auf. Sie sind sehr klein und trotz mehrfacher Reinigung über Einzelplaquepassagen vielfach heterogen in ihrem Aussehen (klar oder trüb, mit oder ohne Rand).

2. QUALITATIVE UNTERSUCHUNG DER PHAGEN-WIRTSPEZIFITÄT (PHAGENTYPISIERUNG)

Zur qualitativen Untersuchung der Phagenvermehrung auf unterschiedlichen Wirten (Phagentypisierung) wurden je nach Fragestellung einfache Tropftests (mit niedrigem Phagentiter) oder Tropftests mit hochtitrigen Lysaten durchgeführt. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Abschnitt C.V.4. (S.19) beschrieben. Die dabei jeweils ausgegossene Menge von 8×10^6 Bakterien pro ml Weichagar wurde zuletzt in der Literatur als günstigste Konzentration für Weichagar-Versuche mit *R.meliloti* beschrieben (L 5). Als Phagenproben wurden die von TRAEG und RÖSCH charakterisierten Lysate von Ø18-1-3, Ø31-4-1, Ø20-1-1, Ø32-3-2, Ø30-33-3, Ø33-1-1, Ø1-37-1 und Ø29-1-1 verwendet, die der besseren Übersicht halber mit Ø18, Ø31, Ø20, Ø32, Ø30, Ø33, Ø1 und Ø29 abgekürzt wurden. Die verwendeten Lysate wurden im allgemeinen über Platten angereichert. Bei einigen Tropfversuchen mit Ø30 wurden über Flüssigkultur angereicherte Phagen verwendet.

Rhizobiaceae	Pseudomonadaceae	Enterobacteriaceae	Bacillaceae
R.léguminosarum 300 R.trifolii 30141	P.aeruginosa B4/1 X.badrii 11672 X.holciicola 13461 X.malvacearum 9924	E.coli K12 HB101 E.coli K12 C600 E.coli C P.stuartii 164 S.marcescens S _b	B.subtilis 168 B.circulans 14-24 B.globigii B.amyloliquefaciens H

Tab. 16 Im Rahmen der Phagentypisierung verwendete Kontrollstämme

Um mögliche Einflüsse des jeweiligen Mediums auf das Ergebnis der Tropftests auszuschalten, wurde für alle Versuche LL-, NB-, TY- und YSM-Medium und der entsprechende Weichagar verwendet. Jeder einzelne Tropfversuch wurde zudem mindestens zweimal wiederholt. Zur Kontrolle der Spezifität der Phagenvermehrung wurden die Tropftests unter sonst gleichen Bedingungen auch mit den in Tab. 16 aufgeführten, systematisch weiter entfernten Bakterienstämmen durchgeführt.

2.1. Einfache Phagentypisierungs-Versuche mit 10^5 Phagen

Zur qualitativen Untersuchung der (weitgehend) ungehemmten Phagenvermehrung wurden 10^5 Phagen pro Platte bzw. Sektor aufgetropft. Diese Menge entspricht der für Phagentypisierungsversuche mit *Rhizobium* optimalen Phagenkonzentration (L 5, S19). Die aus den Klassen I bis V untersuchten Bakterienstämme bzw. Phagen-Wirts-Kombinationen sind ebenso wie die zugehörigen, nach "+" (Lyse) oder "-" (keine Lyse) aufgeschlüsselten Ergebnissen aus Tab. 17 ersichtlich.

Es zeigte sich, daß in der Regel die für Wirte einer bestimmten Klasse spezifischen Phagen, unabhängig vom verwendeten Medium, sich ohne erkennbare Inaktivierung nur auf Wirten dieser einen Klasse vermehrten, d.h. bei der vorgegebenen Phagenmenge von 10^5 nur dort Hemmhöfe von vergleichbarer Größe erzeugten, wobei aus allen Hemmhöfen nunmehr für den neuen Wirt spezifische Phagen isoliert werden konnten. Die wichtigste Ausnahme bildete zunächst die Klasse I. Während Ø18 auf 18-1 (dem ursprünglichen Wirt) und allen übrigen untersuchten Stämmen dieser Klasse in der Größe kaum zu unterscheidende Hemmhöfe bewirkte, konnte sich kein einziger der 10^5 aufgetropften Phagen von Ø31 auf den untersuchten *A. tumefaciens*-Wildtypstämmen (Stammnummern mit 18-) vermehren. Dagegen vermehrte sich Ø31 auf allen untersuchten Minimaltypstämmen mit vergleichsweise derselben Effektivität, darunter auch den durch Konversion aus 18-30 hervorgegangenen Stämmen 31-22 und 31-25, die durch den Besitz eines zusätzlichen kleinen *Agrobacterium*-Plasmids ausgezeichnet sind (B 4). Bekanntlich werden *A. tumefaciens*-Wildtypstämme durch streßbedingten Verlust oder Umstrukturierung ihres Ti-Plasmids in Minimaltypstämme umgewandelt (W. HEUMANN, pers. Mitteilung). Dies war ein deutlicher Hinweis darauf, daß das unterschiedliche Verhalten von Ø31 und Ø18 (und möglicherweise auch die Tatsache, daß DNA aus 31-4 von Atu-18 I, aber nicht DNA aus 18-1 von Atu-31 I *in-vitro* gespalten wird) in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Besitz oder Fehlen eines funktionellen Ti-Plasmids stand.

Weitere Ausnahmen ergaben sich innerhalb der Klasse II. Während alle übrigen von Ø20 oder Ø32 infizierten Bakterienstämme dieser Klasse gleichermaßen stark lysiert wurden, erwiesen sich die Stämme 20-23, 20-50 und MV II/1 als absolut resistent gegen die aus beiden Lysaten jeweils aufgetropften 10^5 Phagen. Dies

steht in völliger Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Restriktionsanalyse wonach exakt die DNA dieser drei Wildtyp-Stämme, im Gegensatz zu den sonstigen Vertretern dieser Klasse, vom klasseneigenen Restriktionsenzym Rre I *in-vitro* gespalten wurde.

		Klasse							
		I		II		III	IV		
		ø18	ø31	ø20	ø32	ø30	ø33	ø1	ø29
Klasse I	18-1	+	-	-	-	-	-	-	-
	18-18	+	-	-	-	-	-	-	-
	18-23	+	-	-	-	-	-	-	-
	18-30	+	-	-	-	-	-	-	-
	31-1	+	+	-	-	(+)	-	-	-
	31-4	+	+	-	-	(+)*	(+)	-	-
	31-12	+	+	-	-	(+)*	-	-	-
	31-22	+	+	-	-	(+)*	-	-	-
	31-25	+	+	-	-	(+)*	-	-	-
Klasse II	MV II/1	-	-	-	-	-	-	-	-
	20-23	-	-	-	-	-	-	-	-
	20-50	-	-	-	-	-	-	-	-
	20-1	-	-	+	+	-	-	-	-
	20-43	-	-	+	+	-	-	-	-
	20-45	-	-	+	+	-	-	-	-
	20-46	-	-	+	+	-	-	-	-
	20-47	-	-	+	+	-	-	-	-
	20-48	-	-	+	+	-	-	-	-
	20-49	-	-	+	+	-	-	-	-
	20-54	-	-	+	+	-	-	-	-
	32-3	-	-	+	+	-	-	-	-

Tab.17 Phagentypisierung durch einfache Tropftests

Pro Platte bzw. Sektor wurden 10^5 Phagen aufgetropft. Das Auftreten oder Fehlen (deutlicher) Hemmhöfe ist mit + oder - bezeichnet. Eingeklammerte Pluszeichen stehen für im Mittel 1-2 Einzelplaques pro Platte bzw. Sektor, die in den mit * versehenen Fällen nur bei Phagenanreicherung über Flüssigkultur auftraten.

(Fortsetzung Tab.17)

		Klasse							
		I		II		III	IV		
		Ø18	Ø31	Ø20	Ø32	Ø30	Ø33	Ø1	Ø29
Klasse III	30-6	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-14	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-18	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-25	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-30	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-32	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-33	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-34	-	-	-	-	+	-	-	-
	30-36	-	-	-	-	+	-	-	-
Klasse IV	33-1	-	-	-	-	-	+	+	+
	33-2	-	-	-	-	-	+	+	+
	1-37	-	-	-	(+)	-	+	+	+
	1-42	-	-	-	-	-	+	+	+
	1-56	-	-	-	-	-	+	+	+
	1-624	-	-	-	-	-	+	+	+
	1-932	-	-	-	-	-	+	+	+
	1-99	-	-	-	-	-	+	+	-
	29-1	-	-	-	-	-	+	+	+
	26-1	-	-	-	-	-	+	+	+
Klasse V	4-1	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-17	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-20	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-22	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-23	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-26	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-27	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-42	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-45	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab.17 Phagentypisierung durch einfache Tropftests (Fortsetzung)

Auch die Vermehrung der für die Klasse IV spezifischen Phagen ($\phi 33$, $\phi 1$ und $\phi 29$) bedarf einiger Anmerkungen. Alle drei Phagen bildeten nämlich auf allen untersuchten Wirten dieser Klasse Hemmhöfe von vergleichbarer Größe, obwohl die mit 33- und 1- bezeichneten Stämme (z.B. 33-1 und 1-37 als ursprüngliche Wirte für $\phi 33$ bzw. $\phi 1$) nach den Ergebnissen der Restriktionsanalyse *in-vitro* ein sowohl von 29-1 (Originalwirt für $\phi 29$) als auch von 26-1 nachweislich abweichendes R/M-System besitzen. Es ist daher zu vermuten, daß die zu erwartende Restriktion durch die jeweils anders modifizierten Wirtsbakterien in diesen Fällen umgangen oder ausgeschaltet wurde. Einzig der Stamm 1-99, ursprünglicher Wildtyp der Mehrzahl der untersuchten Vertreter der Klasse IV, erwies sich als resistent gegenüber den 10^5 aufgetropften Phagen von $\phi 29$, wobei sich dieser Stamm jedoch im R/M-System nicht von den übrigen 33- und 1-Stämmen der Klasse IV unterscheidet (W3).

Gelegentlich ließen sich einzelne Phagen auch auf Wirten aus anderen Klassen vermehren (Tab.17), jedoch, da in diesen Fällen nicht mehr als 1-2 Einzelplaques pro Stamm gebildet wurden, mit offensichtlich erheblich geringerer, wenngleich deutlich über der spontanen Mutationsrate liegender Effektivität. Dies deutet auf eine wirtskontrollierte Restriktion der Phagen in diesen Fällen hin. Andererseits wurde keiner der systematisch weiter entfernten Kontrollstämme lysiert, darunter auch die restriktions- und modifikationsdefekten *E.coli*-Stämme C und HB101, was die Spezifität der Phagenvermehrung unterstreicht. Da die beobachteten Phänomene (Phagenvermehrung auf anderen Wirten mit gleich starker oder aber deutlich geringerer Hemmhof-Ausprägung) auch bei 10^{10} aufgetropften Phagen auftraten, wobei die Bildung von Einzelplaques keineswegs mehr auf diese drei Phagen-Wirts-Kombinationen beschränkt blieb, erfolgt eine ausführliche Auswertung dieser Ergebnisse und ihrer Auswirkung auf die Beziehung der einzelnen Klassen zueinander im Zusammenhang mit den im folgenden Abschnitt (2.2.) beschriebenen Resultaten.

2.2. Spezielle Phagentypisierungs-Versuche mit 10^{10} Phagen

Zur qualitativen Untersuchung der Phagenvermehrung bei stark reduzierter Überlebensrate wurden Tropftests mit hochtitrigen Lysaten durchgeführt. Aufgrund von Vorversuchen zur Vermehrung der hier verwendeten Phagen auf Wirten fremder Klassen waren teilweise Überlebensraten zwischen 10^{-7} und 10^{-9} zu erwarten. Um gegebenenfalls auch trotz einer derart hohen Inaktivierung noch Phagenvermehrung nachweisen zu können, wurden pro Stamm nurmehr 10^{10} Phagen aufgetropft. Die untersuchten Phagen-Wirts-Kombinationen sind zusammen mit dem jeweiligen Versuchsergebnis in Tab.18 aufgelistet.

		Klasse							
		I		II		III	IV		
		ø18	ø31	ø20	ø32	ø30	ø33	ø1	ø29
Klasse I	18-1	++	-	-	-	-	(+)	-	+
	18-18	++	-	-	-	-	-	-	+
	31-1	++	++	+	+	+	+	+	(+)
	31-4	++	++	+	+	+	+	+	(+)
	31-22	++	++	+	+	+	+	+	(+)
Klasse II	20-1	-	-	++	++	-	-	-	+
	20-48	-	-	++	++	-	-	-	+
	32-3	(+)	-	++	++	-	-	-	+
Klasse III	30-18	-	-	-	-	++	-	-	-
	30-30	-	-	-	-	++	-	-	-
	30-33	-	-	-	-	++	-	-	-
Klasse IV	33-1	+	+	+	+	-	++	++	++
	1-37	+	+	+	+	-	++	++	++
	29-1	+	(+)	+	-	-	++	++	++
	26-1	-	-	-	-	-	++	++	++
Klasse V	4-22	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-42	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-45	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 18 Phagentypisierung mit hochangereicherten Lysaten

Pro Platte bzw. Sektor wurden 10^{10} Phagen aufgetropft. Das Auftreten oder Fehlen von Hemmzonen ist mit + oder - bezeichnet. Doppelte Pluszeichen entsprechen deutlichen Hemmhöfen, einfache stehen für >10-20, in Klammern gesetzte Pluszeichen für 1-5 Einzelplaques (jeweils im Durchschnitt pro Platte bzw. Sektor), die in den mit * versehenen Fällen nur bei Anreicherung über Flüssigkultur auftraten.

2.2.1. Spezifität der Phagenvermehrung und Verwandtschaft der untersuchten Bakterienstämme

Als herausragendes Ergebnis dieser Tropftests ist festzuhalten, daß sich offensichtlich die für Wirte einer bestimmten Klasse spezifischen Phagen auch in zahlreichen Vertretern anderer Klassen vermehrten, wobei entweder deutliche Hemmhöfe oder eine beschränkte Zahl von Einzelplaques resultierten. Die Wirtsspezifität der untersuchten Phagen ist in Abb. 16 in Form von dicken (Hemmhöfe) und dünneren Pfeilen (Einzelplaques) dargestellt.

KLASSE

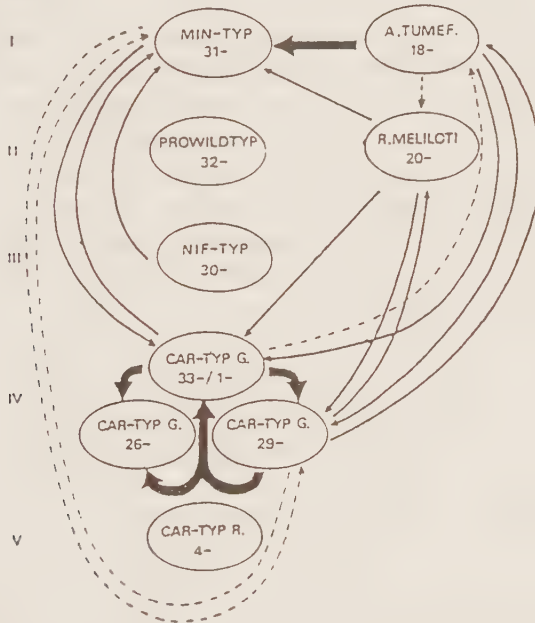


Abb. 16 Wirtsspezifität der untersuchten Phagenstämme

Die Dicke der Pfeile bezieht sich auf die qualitative Untersuchung der Phagenvermehrung gemäß Tab. 18. Dicke Pfeile entsprechen einem doppelten, dünne Pfeile einem einfachen Pluszeichen. Eingeklammerte Pluszeichen wurden durch gestrichelte Pfeile dargestellt. Die Vermehrung von Phagen auf Prowildtyp-Stämmen wurde nicht untersucht. Im Fall von 32-3 handelt es sich um einen defekten Wildtyp-Stamm von *R. meliloti*.

Mit Ausnahme der Stämme der Klasse V, die auch bei 10^{10} aufgetropften Phagen von keinem der untersuchten Phagenstämme lysiert wurden, ergaben sich über die Phagenvermehrung praktisch Verbindungen zwischen allen Klassen (Abb. 16). Zwar konnte, abgesehen vom klasseneigenen Phagen Ø30, auch keinerlei Hemmung der Stämme der

Klasse III beobachtet werden, zudem ließ sich Ø30 außerhalb seiner Klasse nur auf Minimaltypstämmen der Klasse I vermehren, jedoch steht die zuletztgenannte Wirtsgruppe wiederum in enger Beziehung zu den Vertretern der Klassen II und IV (Abb.16), so daß zumindest eine indirekte Beziehung auch zwischen der Klasse III und diesen beiden Klassen besteht.

Unabhängig von ihrem Zustandekommen ließ sich wiederum in allen Fällen das aus den Hemmbereichen isolierte Material eindeutig als Phagen identifizieren und spezifisch auf dem neuen Wirt anreichern. Darüberhinaus erwiesen sich erneut sämtliche zur Kontrolle der Wirtsspezifität herangezogenen Bakterienstämme (Tab.16 auf S.47) trotz signifikant erhöhter Phagenmenge als absolut resistent gegenüber allen untersuchten Phagen. Soweit aufgrund der Zahl der gebildeten Einzelplaques und der Ergebnisse der quantitativen Untersuchungen (Abschnitt II.3.) ein Zustandekommen der Hemmung durch Phagenmutation auszuschließen ist, stehen daher alle Pfeile der Abb.16 unabhängig von Größe und Zahl der Hemmhöfe bzw. Plaques für spezifische Phagenvermehrung und müssen demnach auf dem Vorhandensein der entsprechenden oder einer sehr ähnlichen Adsorptionsstelle in der Bakterienzellwand (und einer weitgehenden Übereinstimmung in der Art und Weise der Phagenexpression) beruhen. Dies demonstriert eindeutig die verwandtschaftliche Zusammengehörigkeit der verschiedenen Stämme der Klassen I bis IV innerhalb des Systems der Rhizobiaceen.

2.2.2. Qualitative Betrachtungen zur Effektivität der Phagenvermehrung

Wie schon beim Tropftest mit 10^5 Phagen erzeugten alle für eine gegebene Klasse spezifischen Phagen, von vereinzelt Ausnahmen abgesehen, in gesetzmäßiger Weise auf den Vertretern dieser Klasse deutliche Hemmhöfe von vergleichbarer Stärke, während bei Infektion von Wirten aus anderen Klassen nur jeweils eine beschränkte Anzahl von Einzelplaques resultierte und vielfach keine Phagenvermehrung stattfand (Abb.16 und Tab.18). Dabei erwiesen sich weiterhin die aus den Klassen III und V untersuchten Stämme als resistent gegenüber klassenfremden Phagen. Auch sonst wurde, soweit die verwendeten Phagen und Wirte der gleichen Klasse angehörten und dieselben Phagen-Wirts-Kombinationen untersucht wurden, völlige Übereinstimmung mit den Ergebnissen der einfachen Tropftests erzielt. Dies gilt auch für die besonderen Verhältnisse innerhalb der Klassen I und IV. Die, erfolgreiche Infektion vorausgesetzt, stets signifikant geringere Phagenvermehrung auf Wirten aus anderen Klassen liefert, wie schon aus den Ergebnissen der Restriktionsanalyse *in-vitro* abzuleiten, erneut deutliche Hinweise darauf, daß tatsächlich die Modifikation innerhalb jeder der Klassen I bis IV (unter Berücksichtigung der genannten Ausnahmen) für sich einheitlich ist und die so modifizierte

DNA aufgrund der unterschiedlichen R/M-Systeme von Vertretern der jeweils anderen Klassen auch *in-vivo* restringiert wird, zumindest dort, wo bei 10^{10} aufgetropften Phagen noch Einzelplaques nachgewiesen wurden.

Die aus Tab. 18 hervorgehenden Einschränkungen einer generellen Vermehrung der Phagen in allen Wirten des *Rhizobiaceen*-Systems hatten zur Konsequenz, daß innerhalb der Klassen I, II und IV offensichtlich unterschiedliche Wirtsgruppen vorlagen, die innerhalb der Klasse I in gleich starkem Maß durch die beiden darin zusammengefaßten Gruppen (Minimaltyp und *A. tumefaciens*-Wildtyp)repräsentiert wurden. Demgegenüber befanden sich in den beiden anderen Klassen die von der allgemeinen Norm abweichenden Wirtsgruppen (20-23, 20-50 und MV II/1 in Klasse II, 29-1 und 26-1 in Klasse IV) deutlich in der Minderheit. Die vielfach fehlende Plaquebildung in einer Reihe von Beispielen zeigt, daß neben z.T. sehr hohen Restriktionsraten auch die Adsorption und intrazelluläre Vermehrung der Phagen betreffenden Faktoren, nicht nur bei identischer DNA-Modifikation der Wirtsstämmen, das Ergebnis der Infektion maßgeblich beeinflussen können. Umgekehrt müssen Unterschiede im R/M-System nicht zwangsläufig die Effektivität der Phagenvermehrung reduzieren, wie die Beispiele innerhalb der Klasse IV aufzeigen. Der erhebliche Anteil wirtskontrollierter Restriktionsvorgänge an der beobachteten Spezifität der Phagenvermehrung wird allerdings klar, wenn man die Ergebnisse der Tropfversuche nach der "Affinität" der einzelnen Klassen bzw. Wirtsgruppen zu den eingesetzten Phagen aufschlüsselt. Dabei wird ein deutliches Gefälle in der Nutzung durch die jeweiligen Phagen offenbar, wobei die Stämme der Minimaltyp-Reihe von allen untersuchten Wirtsgruppen am häufigsten (nämlich von allen Phagen) lysiert wurden. Relativ häufig (von allen Phagen mit Ausnahme von Ø30) wurden auch die mit 33- und 1- bezeichneten Stämme, die die Hauptwirtsgruppe der Klasse IV darstellen, als Wirte benutzt. Das andere Extrem, läßt man die durchwegs resistenten Klassen III und V außer acht, bildeten die Stämme der Klasse II, die außer von den klasseneigenen Phagen Ø20 und Ø32 nur von Ø29, dem Phagen mit dem nachweislich größten Wirtsbereich, und in einem Fall (32-3) auch von Ø18 erfolgreich infiziert wurden. Auch innerhalb der *A. tumefaciens*-Wirtsgruppe konnte nur selten Phagenvermehrung beobachtet werden. Neben den von Ø18 (spezifisch für diese Wirtsgruppe) erzeugten Hemmhöfen traten Einzelplaques außer nach Infektion von 18-1 mit Ø33 erneut nur bei Vermehrung von Ø29 auf. Alle übrigen Phagen verhielten sich, was die Vermehrung auf den beiden Wirtsgruppen der Klasse I betrifft, ähnlich diskriminierend wie Ø31.

3. QUANTITATIVE UNTERSUCHUNG DER PHAGEN-WIRTSPEZIFITÄT

Durch die im folgenden Abschnitt beschriebene quantitative Untersuchung der Vermehrungsrate auf fremden Wirten aus unterschiedlichen Klassen bzw. Wirtsgruppen wurde insbesondere der Anteil wirtskontrollierter Restriktionsvorgänge an der beobachteten Spezifität der Phagenvermehrung bestimmt. Dies geschah mit Hilfe der in C.V.4. (S.20) beschriebenen Komplextitierbestimmungen, wobei wiederum die für *R.meliloti* optimale Menge von $2,5 \times 10^7$ Indikatorbakterien pro Platte (siehe voriger Abschnitt) ausgegossen wurde. Für jede Phagen-Wirtsgruppen-Kombination, bei der im Tropftest auch nur die geringste Phagenvermehrung nachgewiesen werden konnte, wurde mindestens ein repräsentativer Phagenstamm ausgewählt und sowohl für das ursprüngliche Lysat als auch die nach Vermehrung auf dem jeweils fremden Wirt isolierten Phagen der Titer der plaquebildenden Phagen auf dem ehemaligen und jetzigen Wirt bestimmt. Der Phagentiter für den fremden Wirt wurde auf den ursprünglichen Wirt bezogen und auf diese Weise die Effektivität des Plattierens (e.o.p.) ermittelt. Aufgrund der bei einzelnen Kombinationen äußerst niedrigen Überlebensraten (1-5 Einzelplaques bei 10^{10} aufgetropften Phagen) dienten die Titerbestimmungen in diesen Fällen gleichzeitig zur Kontrolle, inwieweit die beobachteten Einzelplaques durch Spontanmutation hervorgerufen worden sein konnten. Um sowohl Mehrfachinfektion als auch das Vorliegen nichtinfizierter Bakterien soweit als möglich auszuschalten, wurde stets eine definierte Multiplizität der Infektion (m.o.i.) von 1 eingehalten. Alle Versuche wurden auf LL- und NB-Platten mit dem entsprechenden Weichagar durchgeführt. Alle im Text angegebenen e.o.p.-Werte entsprechen Durchschnittswerten aus mindestens drei Titerbestimmungen.

3.1. Phagenvermehrung innerhalb der eigenen Klasse

In allen Fällen, in denen aufgrund der Tropfversuche keine Restriktion der Phagenvermehrung durch den fremden Wirt zu erwarten war, wurde die übliche Komplextitierbestimmung auf dem alten und neuen Wirt durchgeführt. Als Phagenproben wurden die ursprünglichen Lysate Ø18, Ø31, Ø20, Ø32, Ø30, Ø33, Ø1 und Ø29 und die nach ihrer Vermehrung auf dem betreffenden Wirtsstamm derselben Wirtsgruppe bzw. Klasse isolierten Phagen eingesetzt. Soweit es sich um fremde Wirtsstämmen gleicher Anfangsnummer (z.B. 31-1, 31-4, 41-12 usw.) handelte, wurde stellvertretend ein repräsentatives Lysat ausgewählt. Zur Bezeichnung der fremdvermehrten Phagen wurden die ersten beiden Ziffern der Stammmummer des neuen Wirts an die abgekürzte Phagen-Stammmummer angehängt. Die verwendeten Phagen und Wirtsstämmen (jeweils nach dem alten und neuen Wirt) sind in Tab.19 zusammengefaßt.

ursprüngliche Phagen- bezeichnung	alter Wirt	Klasse	neuer Wirt	Klasse	neue Phagen- bezeichnung
Ø18	18-1	I	18-18	I	Ø18/18
Ø18	18-1	I	31-4	I	Ø18/31
Ø31	31-4	I	31-1	I	Ø31/31
Ø20	20-1	II	20-48	II	Ø20/20
Ø20	20-1	II	32-3	II	Ø20/32
Ø32	32-3	II	20-1	II	Ø32/20
Ø30	30-33	III	30-18	III	Ø30/30
Ø33	33-1	IV	1-37	IV	Ø33/1
Ø33	33-1	IV	29-1	IV	Ø33/29
Ø1	1-37	IV	33-1	IV	Ø1/33
Ø1	1-37	IV	29-1	IV	Ø1/29
Ø29	29-1	IV	33-1	IV	Ø29/33
Ø29	29-1	IV	1-37	IV	Ø29/1

Tab.19 Zur e.o.p.-Bestimmung verwendete Phagen und Bakterienstämme (Vermehrung innerhalb der eigenen Klasse)

Die einzelnen e.o.p.-Werte gehen aus Tab.20 hervor. Mit einer wichtigen Ausnahme ergab sich dabei eine genaue Korrelation zu den Ergebnissen beider Tropftest-Reihen. Überall, wo ein gegebener Phage auf zwei unterschiedlichen Wirten Hemmhöfe von vergleichbarer Größe erzeugte, lag die e.o.p. auf dem neuen Wirt um 1. Dies betrifft die Vermehrung von Ø18 (aus 18-1) auf 18-18, Ø31 (aus 31-4) auf 31-1, Ø20 (aus 20-1) auf 20-48 und 32-3, Ø32 (aus 32-3) auf 20-1, Ø30 (aus 30-33) auf 30-18, Ø33 (aus 33-1) auf 1-37 und 29-1, Ø1 (aus 1-37) auf 33-1 und 29-1 sowie Ø29 (aus 29-1) auf 33-1 und 1-37 und damit die Vermehrung eines Phagen innerhalb "seiner" Wirtsgruppe bzw. im Fall von Ø33, Ø1 und Ø29 innerhalb der gesamten Klasse IV. Damit wurden alle in diesem Zusammenhang bereits festgestellten Ausnahmen, Anmerkungen und Schlußfolgerungen bestätigt. Mit Ausnahme von Ø1, der sich offensichtlich auf 33-1 etwas besser vermehren ließ als auf dem Originalwirt 1-37, ergab sich dabei auf dem neuen Wirt erwartungsgemäß stets eine Effektivität des Plattierens niedriger als oder bestenfalls gleich 1. Darüberhinaus betrug auch in der Rückrichtung (d.h. bei Infektion des ursprünglichen Wirts

mit dem nunmehr fremdvermehrten Phagen) die e.o.p. jedesmal ungefähr 1, d.h. daß auch in der Rückrichtung die Vermehrung dieser Phagen ohne Restriktion ab- lief, und zwar in gesetzmäßiger Weise mit mindestens der gleichen, häufig so- gar geringfügig höheren Effektivität.

Eine wesentliche Ausnahme bildete die Vermehrung von Ø18 innerhalb der Klasse I. Während im Tropftest alle untersuchten Stämme dieser Klasse mit vergleichsweise derselben Effektivität von Ø18 lysiert wurden, ergab die quantitative Bestimmung für 31-4 eine e.o.p. von 0,02 (für 31-1 wurde eine e.o.p. von 0,012 errechnet) und damit eine 50fach niedrigere Vermehrungsrate als für 18-1. Andererseits be- trug die e.o.p. bei der Rückvermehrung von Ø18/31 auf 18-1 nur mehr $3,3 \times 10^{-5}$. Wurde Ø18 gar auf vollständig anders modifizierten Wirtsstämmen (32-3 und 33-1, nächster Abschnitt) vermehrt, lag die e.o.p. bei der Rückvermehrung (von Ø18/32 bzw. Ø18/33) auf 18-1 trotz unveränderter Adsorptionsstelle nur mehr in der Größenordnung von 10^{-9} (Tab.22)! Hinzu kommt, daß die Effektivität des Plattie- rens bei Restriktion im System der *Rhizobiaceen* ansonsten niemals 10^{-4} über- steigt. Es ist daher so gut wie ausgeschlossen, daß die um Faktor 50-100 schlech- tere Vermehrung von Ø18 auf Minimaltypstämmen auf eine Restriktion der Phagen- DNA zurückzuführen ist.

		Klasse I				Klasse II		
		18-1	18-18	31-1	31-4	20-1	20-48	32-3
Klasse I	Ø18	1,0	0,92	$1,2 \times 10^{-2}$	2×10^{-2}			
	Ø18/18 Ø18/31	1,02 $3,3 \times 10^{-5}$	1,0		1,0			
Klasse I	Ø31			0,87	1,0			
	Ø31/31			1,0	1,07			
Klasse II	Ø20					1,0	0,79	1,05
	Ø20/20 Ø20/32					1,10 1,0	1,0	1,0
Klasse II	Ø32					0,74	0,65	1,0
	Ø32/20 Ø32/20a					1,0 1,0	1,0	1,14 1,16

Tab.20 e.o.p.-Bestimmung bei Phagenvermehrung innerhalb der eigenen Klasse

(Fortsetzung Tab.20)

		Klasse III		Klasse IV		
		30-18	30-33	33-1	1-37	29-1
Klasse III	$\phi 30$ $\phi 30/30$	0,93 1,0	1,0 1,0			
Klasse IV	$\phi 33$			1,0	0,72	0,55
	$\phi 33/1$			1,23	1,0	
	$\phi 33/29$			1,36		1,0
	$\phi 1$			1,21	1,0	1,0
	$\phi 1/33$			1,0	1,0	
	$\phi 1/29$				1,0	1,0
	$\phi 29$			0,85	0,77	1,0
	$\phi 29/33$			1,0		1,48
	$\phi 29/1$				1,0	1,08

Tab.20 e.o.p.-Bestimmung bei Phagenvermehrung innerhalb der eigenen Klasse (Fortsetzung)

Dies war andererseits offensichtlich bei der Rückvermehrung von $\phi 18/31$ auf 18-1 der Fall (die Adsorptionsstelle für den Phagen blieb unverändert erhalten) und bestätigt insofern das Vorliegen eines zusätzlichen R/M-Systems in *A. tumefaciens*-Stämmen. Mögliche Gründe für die behinderte Vermehrung von $\phi 18$ auf Minimaltypstämmen werden im Rahmen der Diskussion genannt, ebenso wie für die vollständige Resistenz von *A. tumefaciens*-Stämmen gegenüber $\phi 31$, die sich, wie insbesondere aus der Vermehrungsrate von $\phi 18/31$ und anderen Phagen auf 18-1 hervorgeht, durch Restriktion alleine nicht befriedigend erklären läßt, wenngleich DNA mit 31-spezifischer DNA-Modifikation in 18-Stämmen nachweislich restringiert wird.

Die hier aufgeführten Beispiele beweisen das Fehlen jeglicher wirtsspezifischen Restriktion bei Vermehrung der Phagen innerhalb derselben Wirtsgruppe. Da andererseits, wie die Restriktionsanalysen zeigen, die betreffenden Stämme nachweislich R/M-Systeme besitzen (auch die Klasse III, wie noch gezeigt wird) und bis

auf die Klasse III, deren R/M-Systeme noch nicht näher charakterisiert sind, DNA aus Vertretern derselben Wirtsgruppe vom bakterieneigenen Restriktionsenzym *in-vitro* nicht gespalten wird, kann dies nur identische DNA-Modifikation der jeweiligen Phagen und Wirtsstämmen dieser Gruppe bedeuten. Weiterhin wird innerhalb der Klasse I die Phagen-DNA nur bei Infektion von *A.tumefaciens*- mit auf Minimaltypstämmen vermehrten Phagen restringiert, aber nicht in umgekehrter Richtung. Dieses Ergebnis wiederholt sich bei der Restriktionsanalyse von Atu-18 I-verdauter 31- bzw. Atu-31 I-verdauter 18-DNA. Da 18-1 und 31-4 auf der biochemischen Seite aber zumindest ein gemeinsames Restriktionsenzym produzieren, demonstriert dies die teilweise identische DNA-Modifikation dieser beiden Unterklassen bei gleichzeitigem Vorliegen eines zusätzlichen R/M-Systems in *A.tumefaciens*-Wildtypstämmen. Auch innerhalb der Klasse IV findet nachweislich keine Restriktion der Phagenvermehrung statt, doch ist dies den molekularbiologischen Untersuchungen zufolge nur im Fall von 33- und 1-Stämmen auch gleichbedeutend mit identischer DNA-Modifikation der jeweiligen Wirtsstämmen. Für die übrigen, durch 29-1 und 26-1 repräsentierten Wirtsgruppen dieser Klasse sind andere R/M-Systeme maßgeblich.

3.2. Vermehrung auf Wirtsstämmen fremder Klassen

Im vorliegenden Abschnitt wurde die Frage geklärt, inwieweit es zwischen den einzelnen Klassen des *Rhizobiaceen*-Systems zu einer Restriktion der Phagen-DNA *in-vivo* kommt. Bei Phagenvermehrung mit Restriktion ist die übliche Komplextitertbestimmung (vgl. C.V.4. auf S.20) auf e.o.p.-Werte $\geq 10^{-5}$ beschränkt. Zur quantitativen Untersuchung der Phagenvermehrung auf fremden Wirtsstämmen aus anderen Klassen konnte diese Methode daher nur in jenen drei Fällen ($\emptyset 32$ auf 1-37, $\emptyset 30$ auf 31-1 und $\emptyset 33$ auf 31-4) und außer bei $\emptyset 30/31$ nur in der einen Richtung angewendet werden, bei der bereits mit 10^5 Phagen Einzelplaquebildung nachweisbar war (Tab.17 auf S.49). In allen übrigen Fällen wurde die variierte Komplextitertbestimmung gemäß C.V.4. (S.20) durchgeführt, bei der noch Überlebensraten bis zu 10^{-10} in eine statistisch auswertbare Zahl von Einzelplaques aufgelöst werden konnten. Als Phagenproben wurden wiederum die ursprünglichen Lysate (siehe 3.1.) und die nach ihrer Vermehrung auf dem jeweiligen fremden Wirtsstamm aus einer anderen Klasse isolierten Phagen eingesetzt (Bezeichnung wie in 3.1.). Die verwendeten Phagen- und Bakterienstämme sind in Tab.21 aufgeführt. Die einzelnen e.o.p.-Werte gehen aus Tab.22 hervor.

ursprüngliche Phagen- bezeichnung	alter Wirt	Klasse	neuer Wirt	Klasse	neue Phagen- bezeichnung
Ø18	18-1	I	32-3	II	Ø18/32
Ø18	18-1	I	33-1	IV	Ø18/33
Ø31	31-4	I	33-1	IV	Ø31/33
Ø20	20-1	II	31-4	I	Ø20/31
Ø20	20-1	II	1-37	IV	Ø20/1
Ø32	32-3	II	1-37	IV	Ø32/1
Ø30	30-33	III	31-1	I	Ø30/31
Ø33	33-1	IV	18-1	I	Ø33/18
Ø33	33-1	IV	31-4	I	Ø33/31
Ø1	1-37	IV	31-4	I	Ø1/31
Ø29	29-1	IV	18-1	I	Ø29/18
Ø29	29-1	IV	31-4	I	Ø29/31
Ø29	29-1	IV	32-3	II	Ø29/32

Tab.32 Zur e.o.p.-Bestimmung verwendete Phagen und Bakterienstämme (Vermehrung auf Wirten aus fremden Klassen)

Tab.33 e.o.p.-Bestimmung bei Phagenvermehrung auf fremden Wirten aus anderen Klassen (S.62)

Die e.o.p.-Bestimmung erfolgte außer bei den mit * gekennzeichneten Spalten durch Anwendung der im Text beschriebenen variierten Komplex-titerbestimmung. Wo die Phagenvermehrung in der Hin- oder Rückrichtung nicht quantitativ erfaßbar war (e.o.p. $< 10^{-10}$) ist dies durch kursive Schreibweise zum Ausdruck gebracht.

Klasse I				Klasse II		Klasse III	Klasse IV	
	18-1	31-1	31-4	20-1	32-3	30-33	33-1	1-37
	1,0 $3,5 \times 10^{-9}$ $1,8 \times 10^{-9}$				$< 10^{-10}$ 1,0		$5,0 \times 10^{-8}$ 1,0	29-1
Ø18 Ø18/32 Ø18/33								
Ø31 Ø31/33			1,0 $2,5 \times 10^{-7}$				$7,5 \times 10^{-7}$ 1,0	
Ø20 Ø20/31 Ø20/1			$6,7 \times 10^{-8}$ 1,0	$1,0$ $< 10^{-10}$ $< 10^{-10}$			$2,5 \times 10^{-7}$ 1,0	
Ø32 Ø32/1					1,0 $3,5 \times 10^{-9}$		$* 3,0 \times 10^{-5}$ 1,0	
Ø30 Ø30/31		$* 1,0 \times 10^{-4}$ 1,0				$1,0$ $* 6,5 \times 10^{-5}$		
Ø33 Ø33/18 Ø33/31	$< 10^{-10}$ 1,0		$* 1,5 \times 10^{-6}$ 1,0				1,0 $8,9 \times 10^{-7}$ $6,7 \times 10^{-7}$	
Ø1 Ø1/31			$9,8 \times 10^{-7}$ 1,0				$1,0$ $2,5 \times 10^{-7}$	
Ø29 Ø29/18 Ø29/31 Ø29/32	$3,9 \times 10^{-8}$ 1,0		$< 10^{-10}$ 1,0		$2,4 \times 10^{-8}$ 1,0			$1,0$ $6,5 \times 10^{-8}$ $8,7 \times 10^{-8}$ $1,9 \times 10^{-9}$

In allen untersuchten Fällen ergab sich wiederum (in der Hinrichtung der Phagenvermehrung) eine genaue Korrelation zwischen den ermittelten e.o.p.-Werten und den Ergebnissen der Tropfversuche. Wo bei 10^{10} aufgetropften Phagen seltene oder gar keine Einzelplaques auftraten, ließen sich auch keine Phagen titern. Wo vorher noch deutlich mehr als 10 Einzelplaques pro 10^{10} Phagen gebildet wurden, wurde jeweils eine Effektivität des Plattierens ermittelt, die signifikant geringer als 1, aber durchaus zahlenmäßig erfaßbar war. In Einklang mit den zunächst durchgeführten einfachen Tropftests resultierten weiterhin die relativ höchsten Überlebensraten (e.o.p. zwischen 1×10^{-4} und $1,5 \times 10^{-6}$) bei jenen anfangs genannten Phagen-Wirts-Kombinationen, die bereits bei 10^5 Phagen minimale Phagenvermehrung zuließen (Ø32 auf 1-37, Ø30 auf 31-1 und Ø33 auf 31-4). Bis auf wenige Ausnahmen erwies sich darüberhinaus auch die Effektivität der Rückvermehrung (d.h. bei Infektion des ehemaligen Wirtsstammes mit dem auf dem fremden Wirt vermehrten Lysat) als gleichermaßen quantitativ erfaßbar und, verglichen mit dem jetzigen Wirt hinter dem Schrägstrich, signifikant kleiner als 1. Da der ursprüngliche Wirt auf jeden Fall die betreffende Adsorptionsstelle aufweisen mußte, scheidet fehlende Adsorption hierfür als Ursache aus, was die Restriktion in diesen Fällen beweist (in Hin- und Rückrichtung) und mutationsbedingte Entstehung der Einzelplaques ausschließt, zumal bei Überlebensraten, die fast immer zumindest in einer Richtung deutlich über der spontanen Mutationsrate liegen.

Abgesehen von den bereits angesprochenen seltenen Kombinationen mit vergleichsweise geringen Inaktivierungsraten, liegen die innerhalb des *Rhizobiaceen*-Systems ermittelten e.o.p.-Werte im Durchschnitt sehr niedrig. Die noch relativ höchste Überlebensrate von $9,8 \times 10^{-7}$ wurde bei der Vermehrung von Ø1 auf 31-4, die relativ niedrigste noch erfaßbare ($3,5 \times 10^{-9}$) bei Infektion von 18-1 mit Ø18/32 (trotz identischer Adsorptionsstelle!) erzielt. Darüberhinaus war ein deutliches Gefälle zwischen den einerseits besonders geringen Überlebensraten auf den Stämmen der Klasse II (20-1, 32-3), der *A.tumefaciens*-Wirtsgruppe (18-1) und dem Stamm 29-1 (Klasse IV) und der um 1-2 Zehnerpotenzen effektiveren Vermehrung auf Minimaltypstämmen (31-1, 31-4) und den übrigen Vertretern der Klasse IV (33-1, 1-37) zu verzeichnen. Im Fall von 31-, 33- und 1-Stämmen muß daher von vergleichsweise niedrigen Restriktionsraten ausgegangen werden, während umgekehrt bei Vermehrung auf *A.tumefaciens*-Wildtypstämmen sehr hohe Restriktionsraten in Kauf genommen werden müssen (außer bei Vorliegen der für 31-Stämme spezifischen DNA-Modifikation), wie die e.o.p. bei der Vermehrung der lediglich in der DNA-Modifikation veränderten eigenen Phagen Ø18/32 und Ø18/33 (Größenordnung 10^{-9}) beweist. Auf die Klasse II wird weiter unten noch eingegangen. Insgesamt spiegeln diese Resultate exakt

die beim Tropftest festgestellte (qualitativ) unterschiedliche Nutzung der einzelnen Wirtsgruppen durch die jeweiligen Phagen wider.

Nicht auf Anhieb ersichtlich war die Restriktion in jenen Fällen (e.o.p. $< 10^{-10}$), in denen die Phagenvermehrung in Hin- und Rückrichtung, bezogen auf den jeweils letzten Wirt, zwar mit wesentlich geringerer Effektivität erfolgte, aber nur in einer Richtung Plaquebildner getitert werden konnten. Dies betraf zum einen jene drei (von insgesamt vier) Phagen-Wirts-Kombinationen, bei denen im Tropftest die quantitativ nicht mehr nachvollziehbare minimale Anzahl von 1-5 Einzelplaques pro 10^{10} Phagen nachweisbar war ($\phi 18$ auf 32-3, $\phi 33$ auf 18-1, $\phi 29$ auf 31-4). Da jedoch in allen drei Fällen die Rückvermehrungsrate (von $\phi 18/32$, $\phi 33/18$ und $\phi 29/31$) auf dem ursprünglichen Wirt quantitativ erfaßbar und signifikant kleiner als 1 war, mußte zumindest die Adsorptionsstelle für den jeweils fremdvermehrten Phagen auf dem alten und neuen Wirt gleichermaßen vorliegen. Damit scheidet eine Auslösung der Einzelplaques in der ursprünglichen Richtung durch Spontanmutation aus, so daß auch in diesen drei Fällen von einer restriktionsbedingten Inaktivierung durch den jeweils fremden Wirt ausgegangen werden muß.

Ferner waren auch jene zwei Kombinationen betroffen, bei denen quantitativ keine Rückvermehrung nachweisbar war ($\phi 20/31$ und $\phi 20/1$ auf 20-1). Da jedoch die Vermehrung des Ausgangslysats ($\phi 20$) in der ursprünglichen Richtung (mit 31-4 bzw. 1-37 als neuem Wirt) mit erheblich geringerer, aber zahlenmäßig erfaßbarer Effektivität ablief, mußte der Stamm 20-1 zwangsläufig den Phagenrezeptor für beide fremdvermehrten Phagen besitzen (die Vermehrung von $\phi 20$ auf 31-4 bzw. 1-37 führt lediglich zur Ausprägung einer veränderten DNA-Modifikation), sofern die Entstehung der mit $\phi 20/31$ und $\phi 20/1$ bezeichneten Phagen durch zufällige Mutation ausgeschlossen werden konnte. Dies war aufgrund der deutlich über der spontanen Mutationsrate liegenden e.o.p. bei der ursprünglichen Vermehrung in der Tat der Fall. Einen zusätzlichen Beweis liefert die Vermehrung des identisch (zu $\phi 20$) modifizierten Phagen $\phi 32$, der sich nach einer Passage auf 1-37, einem der beiden genannten Fremdwirte (als $\phi 32/1$) mit signifikant geringer, aber quantitativ erfaßbarer e.o.p. ($3,5 \times 10^{-9}$) auf dem ursprünglichen Wirt 32-3 rückvermehrte ließ. Dies zeigt, daß auch bei der Phagen-Wirt-Wechselbeziehung zwischen 20-1 und 31-4 bzw. 20-1 und 1-37 mit Sicherheit Restriktion eine entscheidende Rolle spielt. Die Frage nach zusätzlichen Inaktivierungsmechanismen, die möglicherweise u.a. die Vermehrung von $\phi 20/31$ und $\phi 20/1$ auf 20-1 schließlich gänzlich verhindern, wird im Rahmen der Diskussion erörtert. Die allgemein bei der Phagenvermehrung auf 20-1 oder 32-3 bemerkenswert niedrigen Überlebensraten lassen jedoch zumindest auf eine generell sehr massive Restriktion durch die Vertreter der Klasse II schließen.

Die quantitativen Untersuchungen zur Wirtsspezifität der Phagen gegenüber Stämmen aus anderen Klassen beweisen, daß auch die Klasse III durch den Besitz eines klassenspezifischen R/M-Systems ausgezeichnet ist. Darüberhinaus demonstrieren sie zweifelsfrei das Vorliegen wirtskontrollierter Restriktionsvorgänge bei Vermehrung eines Phagen auf Wirten aus fremden Wirtsgruppen, wie sie in 2.2. definiert wurden. Dies steht in völliger Übereinstimmung mit den im molekularbiologischen Teil erhobenen Befunden.

E. DISKUSSION

Aufgrund von Streßumwandlungsexperimenten stellte HEUMANN 1982 das hier untersuchte Genomstrukturierungs-Schema der *Rhizobiaceen* auf (H9). Darin wird diese Bakterienfamilie zusammen mit den daraus durch Mutation oder Konversion umgewandelten Stämmen in fünf separate Klassen unterteilt, basierend auf der Klassenspezifität der verfügbaren morphologischen, genetischen und biochemischen Daten (A2,B4,G9,H5,H6,R10,S1). Erstmals wurden auch die bislang als *Pseudomonas rhodos* (H2,H3) beschriebenen roten Carotinoidstämmen der Klasse V aufgenommen. Aufgabe dieser Doktorarbeit war es, die R/M-Systeme der einzelnen Klassen des ausgewählten Systems nachzuweisen, zu charakterisieren und miteinander zu vergleichen. Dadurch sollte die im Konversionsschema von HEUMANN vorgenommene Einteilung der Klassen überprüft und zudem festgestellt werden, inwieweit diese Systeme zur Klassifizierung von *Rhizobiaceen*-Stämmen herangezogen werden können.

1. VERWANDTSCHAFT DER UNTERSUCHTEN BAKTERIENSTÄMME

Für die Stämme der Klassen I bis IV konnten wirtsspezifische Phagen direkt aus der Komposterde eines Leguminosenbeets gewonnen werden. Das zeigt, daß neben den bereits am natürlichen Standort isolierten Stämmen auch die übrigen Vertreter dieser Klassen (oder sehr nahe verwandte Stämme) natürlich vorkommen. Auch zahlreiche rote Carotinoidstämmen wurden aus natürlichen Biotopen isoliert (H2,H3,T1), wengleich keine spezifischen Phagen für diese Klasse (V) gefunden wurden.

Von herausragender Bedeutung ist der Wirtsbereich der isolierten Phagen. Bekanntlich ist die Adsorption die erste essentielle Voraussetzung für die erfolgreiche Vermehrung eines Phagen (A1). Da Phagen nur Bakterien infizieren, welche dieselbe oder zumindest eine sehr ähnliche Adsorptionsstelle tragen (A1), stellt die Rezeptorstelle für einen gegebenen Phagen ein absolutes Verwandtschaftskriterium in Bezug auf die befallenen Wirtsbakterien dar. Zumeist ist der Wirtsbereich eines Phagen dabei auf wenige Bakterienstämme einer Species beschränkt, kann aber in selteneren Fällen auch ein ganzes Spektrum unterschiedlicher Wirte aus zwei oder mehr nahe verwandten Species umfassen (A1). Solche polyvalenten Phagen sind u.a. innerhalb der Enterobakterien verbreitet (A1). Schon 1926 entdeckte d'HERELLE einen (gereinigten) Phagen, der mehrere Stämme von *Shigella*, *E.coli* und einige paratyphoide Erreger befiel (D3). Ungewöhnlich ist auch das Beispiel des Phagen P3 von *Salmonella potsdam*, dessen Wirtsbereich sich über verschiedene Serotypen von *Salmonella* und *E.coli* erstreckt (B15).

Bei ausreichender Phagenmenge ließen sich die für Wirte einer bestimmten Klasse spezifischen Phagen, wenngleich mit wesentlich verminderter Effektivität, auch auf zahlreichen Stämmen aus anderen Klassen vermehren, während kein einziger von 15 systematisch mehr oder weniger entfernten Kontrollstämmen in irgendeiner Weise spezifisch gehemmt wurde. Mit Ausnahme der Klasse V, deren Vertreter auch bei 10^{10} aufgetropften Phagen von keinem der eingesetzten Phagenstämmen lysiert wurden, ergaben sich dabei über die Phagenvermehrung praktisch Querverbindungen zwischen allen Klassen. Da in allen Fällen das aus dem jeweiligen Hemmbereich isolierte Material eindeutig Phagencharakter aufwies, Spontanmutation als mögliche Ursache einer minimalen Einzelplaquebildung aufgrund der quantitativen Befunde ausgeschlossen werden konnte, und alle Phagenlysate über mehrere Einzelplaquepassagen gereinigt wurden, müssen alle Hemmhöfe oder Plaques somit auf dem Vorhandensein der erforderlichen (gleichen oder sehr ähnlichen) Adsorptionsstelle für den jeweiligen Phagen in der Bakterienhülle und einer weitgehenden Übereinstimmung im Mechanismus der Phagenvermehrung beruhen. Zudem konnten die wenigen die Restriktion überlebenden Phagen (mit signifikant geringerer Effektivität) auch wieder auf dem ehemaligen Wirt vermehrt werden. Beide Ergebnisse zusammen demonstrieren die verwandtschaftliche Zusammengehörigkeit der verschiedenen Stämme der Klassen I bis IV innerhalb des Systems der *Rhizobiaceen*.

Zwar ist derzeit noch keine Verwandtschaft dieser Klassen mit den roten Carotinoid-Typ-Stämmen (Klasse V) über spezifische Phagenvermehrung gegeben, nicht zuletzt, weil noch kein Phage für die Vertreter dieser Klasse isoliert werden konnte, ihre Zugehörigkeit zum System der *Rhizobiaceen* wird jedoch durch ihr einzigartiges Carotinoidmuster dokumentiert. Das für die rote Färbung dieser Bakterien verantwortliche Endprodukt der Carotinoid-Biosynthese (K4) wird ansonsten in der Natur nur von einer Handvoll anderer Bakterienstämme, darunter dem in Australien isolierten roten *Rhizobium*-Stamm CB376 produziert (K5), der nachweislich die dort beheimatete Leguminose *Lotonis bainesii* noduliert und dabei effektiv Stickstoff fixiert (N3). Auch die von TAUSCH isolierten fakultativ methylo trophen roten Bodenbakterien (T1) stimmen im Carotinoidmuster mit den von HEUMANN isolierten Stämmen überein (W.HEUMANN, pers.Mitteilung). Die Verwandtschaft zu den anderen Klassen des Systems ergibt sich ferner aus der Existenz einer weiteren Klasse von Carotinoid-Stämmen (Klasse IV) im System der *Rhizobiaceen* (H4,K3), aus der hohen Fertilität der roten Stämme mit den Vertretern der Klassen III und IV (H8) und aus der Tatsache, daß bei mehreren Parallelversuchen die bei Streßbehandlung aller übrigen Klassen auftretenden Konvertanten stets einen erheblichen Anteil an roten Carotinoid-Stämmen enthielten (W. HEUMANN, pers.Mitteilung).

2. DIE RESTRIKTIONS- UND MODIFIKATIONSSYSTEME DER RHIZOBIACEEN: ALLGEMEINE ÜBERSICHT

Der eigentliche Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Untersuchung der Restriktions- und Modifikationssysteme der einzelnen Klassen des *Rhizobiaceen*-Systems. Wirtskontrollierte R/M-Systeme wurden mittlerweile in vielen Bakteriensystemen nachgewiesen (A7,A8,M10,R2). Ihre Eignung zur Typisierung bzw. Klassifizierung verwandter Bakterienstämme wurde in einer Reihe von Fällen unter Beweis gestellt (B23,B37,D25,U1). Aufgrund von *in-vivo* und *in-vitro* Untersuchungen zur Wirtsspezifität der isolierten Phagen konnte erstmals die generelle Verbreitung von R/M-Systemen innerhalb der *Rhizobiaceen* und deren biologische Relevanz demonstriert werden. Abgesehen von dem durch das Enzym Rle I charakterisierten R/M-System von *R. leguminosarum* 300, einem Stamm, der eine weitere Symbiosespezifität innerhalb der Rhizobien verkörpert, wurden insgesamt sechs wirtskontrollierte R/M-Systeme jeweils unterschiedlicher Spezifität in den Klassen I bis IV nachgewiesen, davon jeweils zwei innerhalb der Klassen I und IV. Unter den bekannten Bakterienfamilien findet sich nicht selten und über alle möglichen Gruppen verteilt eine vergleichbare Zahl unterschiedlicher R/M-Systeme oder Restriktionsenzyme (M10,R3). Eine besonders reichhaltige Ausstattung mit R/M-Systemen ist insbesondere bei *Haemophilus*- (G4,G11,K1,P2,P3,P4) und *Bacillus*-Arten (B13,I1,W2) anzutreffen, die (Enzyme unbekannter Spezifität nicht eingerechnet) alleine jeweils mindestens 14 unterschiedliche Restriktionsenzyme produzieren, deren biologische Abwehrfunktion zum Großteil nachgewiesen ist. Auch die Gattungen *Anaerobaculum*, *Moraxella*, *Nocardia* und *Streptomyces* zeichnen sich, über eine ganze Palette von Species verteilt, durch zahlreiche Restriktionsenzyme unterschiedlicher Spezifität aus (R3). Bei einem Vergleich der *Rhizobiaceen* mit anderen gramnegativen Bodenbakterien ragen insbesondere die diversen *Xanthomonas*-Arten durch ihren Gehalt an Restriktionsenzymen hervor, wobei mindestens fünf verschiedene Schnittspezifitäten nachgewiesen wurden (R3). Auf der Ebene der einzelnen Species finden sich alleine unter den *E. coli*-Wildtypstämmen mindestens acht verschiedene, nachweislich im Dienst der biologischen Restriktion stehende R/M-Systeme, von denen drei durch Typ II-(B3,G1,Y2) und fünf weitere durch Restriktionsenzyme vom Typ I (A8,A9,M7,R9) oder III (A9,G3) repräsentiert sind. Mindestens sieben biologisch aktive R/M-Systeme (darunter eines vom Typ III) wurden bislang bei einer Vielzahl von *Haemophilus influenzae*-Stämmen beschrieben (G4,G11,K1,P2,P3,P4). Eine ähnlich große Zahl unterschiedlicher Restriktionsenzyme findet sich noch bei *Bacillus stearothermophilus* (R3) und *Herpetosiphon giganteus* (R3).

Abgesehen von *E.coli*, *Haemophilus influenzae* und einigen *Bacillus*-Arten werden bakterielle R/M-Systeme allerdings erst in wenigen Fällen außer von der biologischen auch (zumindest teilweise) von der biochemischen Seite her untersucht, u.a. bei *Anabaena*, *Nostoc* (D6), *Pseudomonas* (J1), *Diplococcus* (L1), *Staphylococcus* (S22), *Streptococcus* (F1) und *Streptomyces* (C2,C3,K2). Dabei konnte meist eine Korrelation zwischen der Restriktion der Phagenvermehrung *in-vivo* und der *in-vitro* Spaltung ihrer DNA durch die aus den jeweiligen Bakterien isolierten Restriktionsenzyme hergestellt werden. Die geschilderten Ergebnisse stehen auch im Fall dieser Doktorarbeit weitgehend in Übereinstimmung mit den molekularbiologischen Erkenntnissen. Abgesehen von der Klasse III, für die nur eine sehr schwache Restriktionsaktivität nachgewiesen werden konnte, die nicht weiter verfolgt wurde, und den Stämmen 29-1 und 26-1, deren DNA aufgrund von Restriktionsanalysen eine von den übrigen Vertretern der Klasse IV abweichende DNA-Modifikation aufweisen muß, konnten alle *in-vivo* erhaltenen Ergebnisse durch Analyse der Verdauung von bakterieller Gesamt-DNA *in-vitro* bestätigt werden. Zunächst aufgetretene Widersprüche (Stämme 29-1 und 26-1) ließen sich jedoch durch einfache Erklärungen (siehe Kapitel E.3.) beseitigen.

Mit Ausnahme der *R.meliloti*-Stämme 20-23, 20-50 und MV II/1 (Klasse II) sowie der beiden genannten Vertreter der Klasse IV zeichneten sich alle untersuchten Stämme einer Klasse durch einheitliche Modifikation ihrer DNA und damit durch ihr individuelles, von jeder der drei anderen Klassen verschiedenes R/M-System aus. Während es aus diesem Grund, abgesehen von Klasse I, niemals zur Restriktion von DNA aus einem Vertreter derselben Klasse kommt, unterliegt die DNA-Übertragung zwischen den Klassen einer sehr starken Restriktion durch das jeweilige bakterieneigene R/M-System. Dies gilt sowohl *in-vivo*, soweit der betreffende Phagenrezeptor vorliegt und nachweislich Phagennachkommen freigesetzt werden, als auch *in-vitro*, sofern die Erkennungssequenz des jeweiligen Restriktionsenzyms vorliegt und als Fremd-DNA erkannt wird. Innerhalb der Klasse I kommt es zudem zu einer Restriktion von Minimaltyp-spezifischer DNA in *A.tumefaciens*-Stämmen (aber nicht umgekehrt!), da letztere über ein zusätzliches R/M-System verfügen. Die Analyse der R/M-Systeme der Klasse II bezieht sich allerdings nur auf *R.meliloti*-Wildtypstämmen. Echte Prowildtypstämmen *per definitionem* (S1) wurden nicht untersucht, da erst in jüngster Zeit mit 32-17 ein solcher Stamm aus *R.meliloti* gewonnen werden konnte (S1).

Für die Stämme der Klasse V konnte die Existenz eines R/M-Systems weder *in-vivo* noch *in-vitro* festgestellt werden. Die Tatsache, daß jedwede Gesamt-DNA dieser Bakteriengruppe von allen sechs eingesetzten Restriktionsenzymen *in-vitro* gespalten wurde, schließt für sich allein das Fehlen eines R/M-Systems nicht aus. Das

Vorliegen eines solchen Systems ist jedoch zu fordern, soll die Eigenständigkeit dieser Klasse durch fortgesetzten Genaustausch nicht zerstört werden. Tatsächlich konnte RÖSCH vor kurzem definierte λ -Restriktionsmuster mit dem Rohlysat des Stammes 4-42 reproduzieren (A.RÖSCH, pers.Mitteilung). Aufgrund der Restriktionsanalysen ist jedoch für die Stämme der Klasse V, sofern überhaupt ein einheitliches R/M-System vorliegt, ein gänzlich anderes Restriktions- und Modifikationssystem zu erwarten als beispielsweise bei den Klassen I, II und IV. Übereinstimmung könnte theoretisch allenfalls mit den noch nicht näher untersuchten R/M-Systemen der Klasse III bestehen.

Die Übereinstimmung in der DNA-Modifikation innerhalb einer Klasse stellt ein bemerkenswertes Resultat dar und unterstreicht die verwandtschaftliche Zusammengehörigkeit der betreffenden Stämme. Eine Einzelbesprechung der R/M-Systeme aller vier Klassen in Bezug auf die *in-vivo* und *in-vitro* erhobenen Befunde erfolgt im anschließenden Kapitel. Insgesamt bestätigen die hier geschilderten Untersuchungen damit die von HEUMANN vorgenommene Klasseneinteilung und weisen die R/M-Systeme der verschiedenen Klassen der *Rhizobiaceen* in der Tat als geeignet zur Klassifizierung der Stämme dieser Bakterienfamilie aus. In diesem Zusammenhang kommt der Aufklärung der R/M-Systeme weiterer *Rhizobium*-Wildtypstämme besondere Bedeutung zu.

3. EINZELBESPRECHUNG DER VERSCHIEDENEN KLASSEN

3.1. Klasse I

Innerhalb der Klasse I läßt sich aus 18-1 und 31-4 dasselbe schnittspezifische Restriktionsenzym Atu-31 I isolieren. Dieses Enzym (aus 31-4) spaltet *in-vitro* weder Gesamt-DNA aus *A.tumefaciens*- noch aus Minimaltypstämmen. Ferner vermehrt sich der *A.tumefaciens*-spezifische Phage $\phi 18$ (aus 18-1) im Tropftest mit vergleichsweise derselben Effektivität auf allen untersuchten 18- und 31-Stämmen und mit signifikant höherer Rate als auf jenen Stämmen, von denen er restringiert wird. Dies läßt den Schluß zu, daß die getesteten *A.tumefaciens*- und Minimaltypstämme ein identisches R/M-System beinhalten, das höchstwahrscheinlich vom homologen Chromosom, möglicherweise auch vom 300 Md-Plasmid kontrolliert wird. Auf der anderen Seite wurde mit einer abgewandelten Isolierungsmethode ein zweites, wesentlich aktiveres Restriktionsenzym vom Typ II (Atu-18 I) aus 18-1 gereinigt, das weder *A.tumefaciens*-Gesamt-DNA noch DNA des Phagen $\phi 18$ *in-vitro* spaltete, während Gesamt-DNA aus 31-Stämmen und die DNA der Phagen $\phi 31$ und insbesondere $\phi 18/31$ *in-vitro* fragmentiert wurde. In Einklang damit plattierte $\phi 18/31$ auf 18-1 (trotz unveränderter Adsorption) mit signifikant geringerer

e.o.p. ($3,3 \times 10^{-5}$), verglichen mit dem neuen Wirt 31-4. Dies kann nur bedeuten, daß die untersuchten *A.tumefaciens*-Stämme über ein zweites, in 31-Stämmen abwesendes wirtskontrolliertes R/M-System verfügen, charakterisiert durch das Restriktionsenzym Atu-18 I. Die Existenz eines gegenüber dem Minimaltyp *in-vivo* und *in-vitro* zusätzlich aktiven R/M-Systems in *A.tumefaciens*-Stämmen rechtfertigt die Unterteilung der Klasse I in zwei verschiedene Wirtsgruppen, die auch durch die quantitative Bestimmung der Phagenvermehrungsraten bestätigt wird. Bekanntlich unterscheiden sich Minimaltypstämme von *A.tumefaciens*-Stämmen regelmäßig und häufig nur durch das Fehlen eines funktionellen Ti-Plasmids (B4). Atu-18 I und das zugehörige Modifikationsenzym werden daher höchstwahrscheinlich vom Ti-Plasmid codiert. Auch in anderen Bakteriensystemen sind Gene für Restriktions- (und Modifikations-)enzyme bisweilen auf Plasmiden lokalisiert (A3, A4, J1, S3), wenngleich die betreffenden Genorte in den meisten Fällen chromosomalen Ursprungs sind (R2, B7). Allein in *E.coli* wurden bislang sechs von (zumeist Resistenz-) Plasmiden determinierte R/M-Systeme gefunden (A9, B3, G1, Y2). Am bekanntesten sind die Restriktions- und Modifikationsenzyme des EcoRI- und EcoRII-Systems, deren Genfunktionen von den Resistenzplasmiden RI und RII bereitgestellt werden (B3, Y2).

Aufgrund der beiden R/M-Systeme verfügen *A.tumefaciens*-Stämme über ein sehr effektives Abwehrsystem *in-vivo*. Selbst der Phage Ø18 kann sich nach einer Passage über fremde Stämme aus anderen Klassen (33-1, 32-3) trotz unveränderter Phagenrezeptorstelle nur noch mit einer Überlebensrate von ca. 10^{-9} (Ø18/33, Ø18/32) auf seinem ehemaligen Wirt 18-1 vermehren. Die Expression zweier R/M-Systeme wird auch bei einer Reihe anderer Bakterienarten oder -stämmen beschrieben. Unter vielen anderen seien hier nur genannt die Systeme P1 und K (L4) bzw. A und 15 (A9) von *E.coli*, die R/M-Systeme L und SA (C6) oder SA und SB (C7) von *S.typhimurium*, die Wirtsspezifitäten A1 und A2 von *H.influenzae* Ra (P2) sowie die Systeme S1 und S2 von *S.aureus* (I2). Bakterien mit mehreren R/M-Systemen zeichnen sich üblicherweise durch in etwa additive Wirkung ihrer Restriktionsenzyme aus (A9, C6, C7, L4, P2, Y2). Diese Beobachtung trifft auch auf 18-1 zu. Während bei Vorliegen beider R/M-Systeme *in-vivo* stets e.o.p.-Werte um 10^{-9} gemessen wurden, lag die e.o.p. bei der Vermehrung verschiedener Phagen auf 31-4 (nur das R/M-System von Atu-31 I) oder von Ø18/31 auf 18-1 (diese Restriktion wird ausschließlich vom Atu-18 I-System kontrolliert) im Durchschnitt zwischen 10^{-5} und 10^{-7} . Die Tatsache, daß Minimaltypstämme als einzige Wirtsgruppe des *Rhizobiaceen*-Systems von sämtlichen eingesetzten Phagen lysiert wurden, wobei im Mittel mit 10^{-6} bis 10^{-7} die höchste Überlebensrate aller Gruppen gemessen wurde, steht zudem in Einklang mit der Beobachtung, daß *in-vitro* das aus 31-4 präparativ gewonnene Enzym Atu-31 I

von allen gereinigten Restriktionsenzymen bei weitem die schwächste Aktivität aufwies. Dennoch ist im Vergleich mit vielen bekannten Restriktionssystemen eine immer noch relativ effektive Restriktion *in-vivo* zu verzeichnen.

Die um Faktor 50-100 geringere Vermehrungsrate von Ø18 auf 31-1 und 31-4 (ca. 10^{-2}) ist dagegen sehr wahrscheinlich nicht auf Restriktion der Phagen-DNA zurückzuführen. Phagen- und Wirts-DNA müssen identisch modifiziert sein, da auf der molekularbiologischen Seite 18-1 und 31-4 dasselbe Restriktionsenzym Atu-31 I produzieren und Ø18- ebenso wie 18-1-Gesamt-DNA *in-vitro* nicht von diesem Enzym gespalten wird. Zudem liegt die Überlebensrate von Ø18 auf 31-4 um drei Zehnerpotenzen höher als bei der Rückvermehrung desselben nunmehr 31-spezifisch modifizierten Phagen (Ø18/31) auf 18-1. Viel eher ist zu vermuten, daß in diesem Fall eine ansonsten Ti-codierte Komponente der Bakterienzellwand (genauer: der Adsorptionsstelle für Ø18) in Minimaltypstämmen nicht gebildet wird und daher zu einer schlechteren Anheftung des Phagen beiträgt. Bekanntlich zeigen *A. tumefaciens*-Stämme auf bestimmten Festmedien erheblich schleimigeres Wachstum als die daraus hervorgegangenen Minimaltypstämmen (I.BAUER, pers.Mitteilung). Eine Störung der Adsorption wird zudem auch in anderen Fällen für geringfügig erniedrigte e.o.p.-Werte verantwortlich gemacht (K7,K8).

Einen Spezialfall stellt die auch bei 10^{10} aufgetropften Phagen vollständige Resistenz von *A. tumefaciens*-Stämmen gegenüber Ø31 (spezifisch für 31-4) dar. Sie läßt sich bei einem Vergleich mit der Vermehrung anderer Phagen, insbesondere von Ø18/31, auf 18-1 durch Restriktion alleine nicht befriedigend erklären. Gemäß der e.o.p. von Ø18/31 müßte die Überlebensrate bei Restriktion von Ø31 auf 18-1 mindestens in einer Größenordnung von 10^{-5} oder (bei entsprechend schlechterer Adsorption) knapp darunter liegen. Hier kommt möglicherweise eine weitere Funktion des Ti-Plasmids als (zusätzliche oder Haupt-) Ursache hinzu, die die Adsorption oder intrazelluläre Vermehrung des Phagen verhindert, wobei insbesondere eine Analogie zum Ausschluß des Phagen AP-1 durch Ti-Plasmid-tragende *A. tumefaciens*-Stämme naheliegt (V1). Diese Stämme zeigen Sensitivität gegenüber dem Phagen, ohne daß Phagenvermehrung bzw. die Lyse der Wirtszellen eintritt. Nichtonkogene (Ti-Plasmid-freie) Stämme werden dagegen erfolgreich vom Phagen lysiert. Verlust des Ti-Plasmids führt also zur Wiederherstellung der normalen Phagenvermehrung, und in der Tat vermehrt sich Ø31 mit gleicher Effektivität auf den Ti-Plasmid-freien, aber noch kleinere *A. tumefaciens*-Plasmide beherbergenden, nunmehr Minimaltyp darstellenden Stämmen 31-22 und 31-25 (B4) wie auf typischen Vertretern des Minimaltyps (31-1 und 31-4).

Was die Vermehrung aller Phagen auf 31-4 und der Phagen Ø29 und Ø33 auf 18-1 betrifft, konnte in sämtlichen Fällen wirtskontrollierte Restriktion für die stark verminderte Überlebensrate verantwortlich gemacht werden. Die (im Gegensatz zu Ø33) nicht nachweisbare Vermehrung von Ø1 auf 18-1 ist vermutlich ebenfalls auf sehr hohe Restriktionsraten zurückzuführen. Diese Restriktion wird hauptsächlich durch die in gleichem Maße stattfindende Restriktion der beiden Phagen durch 31-4 belegt. Zudem bewegt sich bereits die minimale Vermehrung von Ø33 auf 18-1 (1-5 Einzelplaques pro 10^{10} Phagen) im Grenzbereich der noch erfassbaren Restriktion. Die Resistenz von 18-1 gegenüber Ø20 und Ø32 scheint dagegen ursächlich mit der fehlenden Adsorption dieser Phagen zusammenzuhängen. Eine Vermehrung von *R. meliloti*-Phagen auf *Agrobacterium*-Stämmen wurde bisher von keinem Autor beobachtet (B9, C9, L5, S19). Das Beispiel von Ø18/32 zeigt zudem, daß bei Vorhandensein der Adsorptionsstelle und Vorliegen der für die Klasse II typischen DNA-Modifikation die e.o.p. der Phagenvermehrung auf 18-1 erfassbar sein kann. Da andererseits Ø20 und Ø32 31-4 erfolgreich lysieren, muß erneut eine Funktion des Ti-Plasmids für die fehlende Adsorption dieser Phagen ursächlich sein. Im Fall von Ø30 ist eine abschließende Begründung für die fehlende Vermehrung auf 18-1 nicht möglich, da außer Minimaltypstämmen auch keine Vertreter aus anderen Klassen von diesem Phagen lysiert wurden und auch keine Phagenlysate von Ø18 oder Ø31 mit 30-spezifischer DNA-Modifikation gewonnen werden konnten. Die erfolgreiche Infektion von 31-Stämmen deutet jedoch auch hier (18-1) auf eine Störung der Adsorption hin.

3.2. Klasse II

Auch innerhalb der Klasse II lassen sich mindestens zwei Wirtsgruppen unterscheiden, die im Gegensatz zur Klasse I jedoch höchstwahrscheinlich unterschiedliche R/M-Systeme aufweisen. Die große Hauptgruppe wird durch die Stämme 20-1 und 32-3 repräsentiert. Aus 20-1 konnte das schnittspezifische Restriktionsenzym *Rme* I gereinigt werden, das *in-vitro* weder die DNA dieser beiden Stämme noch der anderen Vertreter dieser Wirtsgruppe angriff. In Übereinstimmung damit vermehrten sich die Phagen Ø20 (aus 20-1) und Ø32 (aus 32-3) mit derselben Effektivität auf ausgewählten Vertretern dieses R/M-Typs (20-1, 20-48, 32-3). Umgekehrt erwiesen sich die *R. meliloti*-Wildtypstämme 20-23, 20-50 und MV II/1 als resistent gegenüber beiden Phagen, während gleichzeitig die Gesamt-DNA dieser drei Stämme von *Rme* I *in-vitro* fragmentiert wurde. Bei MV II/1, 20-23 und 20-50 handelt es sich allerdings um Bakterien, die selbst oder deren Ausgangsstämme eine von den übrigen untersuchten *R. meliloti*-Wildtypstämmen abweichende geographische Herkunft aufweisen. Da für diese Stämme keine wirtsspezifischen Phagen zur Verfügung standen, konnte das Vorliegen eines R/M-Systems in diesen drei Stämmen

nicht endgültig bewiesen werden, doch müßten in einem solchen Fall diese Wirte unbedingt durch eine von R_{me} I abweichende DNA-Spezifität ihrer Restriktions- und Modifikationsenzyme ausgezeichnet sein.

Ähnlich wie bei *A. tumefaciens* führt auch das R/M-System der R_{me} I-tragenden Stämme zu einer äußerst effektiven Restriktion *in-vivo*. Dies demonstriert das Beispiel des Phagen Ø32/1, der trotz unveränderter Adsorption infolge der erhaltenen 1-spezifischen DNA-Modifikation nur mehr mit einer e.o.p. von $3,5 \times 10^{-9}$ auf 32-3 überlebte. Auch die Phagen Ø29 und Ø18 wurden in derselben massiven Weise restringiert. In einigen Fällen war die Restriktion der Phagen trotz vorhandener Adsorptionsstelle so hoch (Ø20/1 und Ø20/31), daß gar keine Phagenvermehrung mehr nachgewiesen werden konnte. Daß die fehlende Vermehrung von Ø20/1 auf 20-1 tatsächlich auf Restriktion beruht (und nicht etwa auf der durch Spontanmutation bedingten Entstehung des Phagen Ø20/1 im Bakterienrasen von 1-37) zeigt u.a. das Beispiel des Phagen Ø32/1 (e.o.p. $3,5 \times 10^{-9}$ auf 32-3), der in der ursprünglichen, für 32-3 spezifischen DNA-Modifikation (Ø32) keinen quantitativen Unterschied zwischen der Vermehrung auf 20-1 und 32-3 erkennen ließ. Die Vermehrungsraten derjenigen Phagen, die die Stämme 20-1 und 32-3 trotz Restriktion erfolgreich lysierten, liegen im Mittel ähnlich niedrig wie bei den Vertretern des *A. tumefaciens*-Typs (10^{-8} bis 10^{-9}), teilweise sogar darunter ($<10^{-10}$). Damit sind die gemessenen e.o.p.-Werte beider Wirtsgruppen die niedrigsten im gesamten *Rhizobiaceen*-System. Inwieweit analog zu *A. tumefaciens*-Stämmen auch die große Mehrheit der Stämme der Klasse II, wie aus diesen Ergebnissen möglicherweise abzuleiten, tatsächlich über ein zweites, zusätzliches R/M-System verfügen oder aber die bemerkenswerte Effizienz der Restriktion lediglich auf der hohen Aktivität von R_{me} I *in-vivo* beruht, kann derzeit nicht mit Bestimmtheit gesagt werden. Bis heute ließ sich keine zweite sequenzspezifische Endonuklease aus diesen Stämmen reinigen, jedoch wurde noch nicht nach multifunktionellen Restriktionsenzymen gesucht. Kombinierte R/M-Systeme aus Typ II- und I- bzw. Typ II- und III-Enzymen finden sich u.a. bei *E. coli* K12 (M10,Y2) und *H. influenzae* (G10,K1,M10).

Starke Restriktion scheint auch die Ursache für die (im Gegensatz zu 32-3) nicht nachweisbare Vermehrung von Ø18 auf 20-1 zu sein, da zumindest 32-3 eine geeignete Adsorptionsstelle für Ø18 besitzt. Dies stünde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von ROSLYCKY, der im Gegensatz zu anderen Autoren (B5,B9,C5,S21) als einziger bisher eine Vermehrung eines *Agrobacterium*-spezifischen Phagen auf einigen *Rhizobium*-, darunter zwei *R. meliloti*-Stämmen beschrieb (R8). Zudem war ansonsten kein Unterschied in der Phagensensitivität der Stämme 20-1 und 32-3 zu verzeichnen. Eine eindeutige Begründung für die auch bei 10^{10} aufgetropften Phagen ausbleibende Vermehrung von Ø31, Ø30, Ø1 und Ø33 auf 20-1 wie auch 32-3 ist nicht ohne weiteres möglich, da selbst bei vorhandener Adsorptionsstelle (Ø20/1,

Ø20/31) Phagen mit 31- bzw. 1-spezifischer DNA-Modifikation so stark restringiert werden können, daß keine Phagenvermehrung mehr stattfindet. Darüberhinaus konnten keine Phagenlysate von Ø20/30 oder Ø32/30 isoliert werden. Eine Aussage in Hinblick auf das Vorhandensein der jeweiligen Phagenrezeptorstelle muß daher entfallen. Eine Störung der Adsorption ist jedoch in einen oder anderen Fall als einzige oder zusätzliche Ursache für fehlende Phagenvermehrung durchaus vorstellbar.

3.3. Klasse III

Innerhalb der Klasse III zeichnen sich alle untersuchten Stämme durch ein identisches R/M-System aus. Diese Feststellung basiert ausschließlich auf quantitativen Untersuchungen zur Wirtsspezifität des klasseneigenen Phagen Ø30 (isoliert aus 30-33), der auf allen Vertretern dieser Klasse mit derselben Effektivität plattierte. Ein Vergleich mit *in-vitro* Untersuchungen war in diesem Fall nicht möglich, da nur eine äußerst schwache, für eine Enzymreinigung keinesfalls ausreichende Restriktionsaktivität (in 30-33) im Verlauf eines solchen Reinigungsver Versuches nachgewiesen werden konnte. Außer durch Ø30 und Ø30/31 konnte die Lyse der Stämme dieser Klasse (auch bei 10^{10} aufgetropften Phagen) mit keinem der anderen Phagenlysate erreicht werden. Die Überlebensrate von Ø30/31 auf 30-33 (e.o.p. $6,5 \times 10^{-5}$) stellt jedoch nach der e.o.p. von Ø30 auf 31-1 die zweithöchste Vermehrungsrate (für den Fall der Restriktion) im gesamten *Rhizobiaceen*-System dar und korreliert damit mit der sehr schwachen, nicht zu reinigenden Restriktionsaktivität der beiden genannten aus 30-33. Die vergleichsweise niedrige e.o.p. läßt zudem vermuten, daß lediglich ein wirtskontrolliertes R/M-System in den Stämmen der Klasse III aktiv ist und daher zugleich die mangelnde Adsorption für die erfolgreiche Infektion mit anderen Phagen des Systems entscheidend ist.

3.4. Klasse IV

Die Klasse IV zeichnet sich im großen und ganzen durch die einheitliche Wirtsspezifität ihres R/M-Systems aus, wobei von den untersuchten Stämmen nur 29-1 und 26-1 abweichendes Verhalten zeigen. Unter den übrigen, mit 33-1 und 1- bezeichneten Vertretern konnte dieselbe schnittspezifische Endonuklease Rlu-1 I aus den Stämmen 33-1 und 1-624 gereinigt und außerdem im Rohlysat von weiteren drei Stämmen (1-37, 1-56 und 1-99) nachgewiesen werden. Rlu-1 I griff *in-vitro* weder die Gesamt-DNA dieser fünf noch der übrigen getesteten 33- und 1-Stämme an. Auf der anderen Seite vermehrten sich die für 33-1 und 1-37 spezifischen Phagen Ø33 bzw. Ø1 auf allen Vertretern dieser Wirtsgruppe mit gleicher Effektivität.

Aus dem Stamm 29-1 ließen sich gleich zwei schnittspezifische Restriktionsenzyme mit im Unterschied zu Rlu-1 I vollkommen anderer DNA-Spezifität isolieren, von denen jedoch das schwächere (Atu-29 I) in der wesentlich kleinere DNA-Fragmente liefernden "Atu-29 II"-Aktivität enthalten war, da beide Enzyme unter bestimmten Ionenbedingungen identisches Restriktionsmuster bewirkten. Aufgrund der Analyse verschiedenartigster DNA-Sorten scheint die "Atu-29 II"-Aktivität jedoch lediglich die aktivere Form von Atu-29 I darzustellen, wenngleich die Möglichkeit, daß diese Aktivität ein zweites, davon verschiedenes Restriktionsenzym beinhaltet, nicht gänzlich ausgeräumt werden konnte. Über ein mögliches R/M-System des Stammes 26-1 kann dagegen nur wenig ausgesagt werden. Die beobachtete Fragmentierung von 26-1-DNA *in-vitro* durch sämtliche Restriktionsenzyme des *Rhizobiaceen*-Systems legt die Existenz eines individuellen R/M-Systems dieses Stammes zumindest nahe, ohne jedoch das vollständige Fehlen eines solchen Systems als Möglichkeit ganz auszuschließen. || Erstaunlicherweise vermehrten sich jedoch alle drei für die Klasse IV spezifischen Phagen, Ø33 (aus 33-1), Ø1 (aus 1-37) und Ø29 (aus 29-1), ohne jegliche Restriktion auf praktisch allen untersuchten Wirten dieser Klasse (ausgenommen Ø29 auf 1-99), eingeschlossen die Stämme 33-1, 1-37 und 29-1, obgleich aufgrund unterschiedlicher DNA-Modifikation sowohl 29-1-DNA von Rlu-1 I, dem für 33- und 1-Stämme typischen Restriktionsenzym, als auch die DNA aus den zuletzt genannten Stämmen von der "Atu-29 II"-Aktivität aus 29-1 *in-vitro* gespalten wurde. Analoges gilt aufgrund der Tropfversuche auch für den Stamm 26-1, dessen DNA *in-vitro* sowohl von Rlu-1 I (aus 33-1) als auch von der "Atu-29 II"-Aktivität fragmentiert wurde. Damit ist hier der bereits erwähnte Fall eingetreten, daß eine e.o.p. von ungefähr 1 bei der Phagenvermehrung auch auf der Ausschaltung oder Umgehung wirtskontrollierter Restriktionsenzyme anders modifizierter Bakterienstämme beruhen kann. Bezogen auf die Klasse IV scheint das Fehlen der jeweiligen Erkennungssequenz (für Rlu-1 I, die "Atu-29 II"-Aktivität oder ein hypothetisches Restriktionsenzym aus 26-1) auf der DNA der Phagen Ø33, Ø1 und Ø29 am ehesten die ausbleibende Restriktion zu erklären. Vergleichbare Hinweise liegen bei *Streptomyces* vor. Dort wird in einem Fall die restriktionsfreie Vermehrung von acht Phagen auf drei mit unterschiedlichen R/M-Systemen ausgestatteten Species durch selektionsbedingten Verlust der Schnittstelle für die jeweiligen Restriktionsenzyme erklärt (F2). In einer weiteren Arbeit findet bei Phageninfektion von *S. albus* G-Stämmen, die die Typ II-Endonukleasen SalGI und Sal II enthalten, keine Restriktion der Phagen in SalGI-defekten Mutanten (durch Sal II) statt (C4). Tatsächlich wurde weder Ø29-DNA von Rlu-1 I noch Ø33- oder Ø1-DNA von der "Atu-29 II"-Aktivität *in-vitro* gespalten (unveröffentlichte Ergebnisse). Dies schließt zwar eine zufällige Methylierung der jeweiligen Er-

kennungssequenz nicht aus, würde aber im Fall von Ø29 mit dessen außergewöhnlich großem Wirtsbereich (abgesehen von Klasse III und V alle Klassen des *R. meliloti*-*A. tumefaciens*-Systems) korrelieren.

Die ungehemmte Vermehrung der drei Phagen innerhalb der Klasse IV wird nur im Fall von 1-99 durchbrochen. Dieser Stamm erwies sich zumindest bei 10^5 aufgetropften Phagen als insensitiv gegenüber Ø29. Dies hat jedoch vermutlich Ursachen, die nicht im R/M-System begründet liegen. In diesem Stamm ließ sich analog zu anderen Stämmen dieser Wirtsgruppe außer Rlu-1 I kein weiteres Restriktionsenzym darstellen (W3). Zudem war in keinem anderen Fall eine Abweichung im Verhalten von 1-99 gegenüber anderen 33- und 1-Stämmen zu verzeichnen. Da 1-99 ursprünglicher Wildtyp für eine ganze Reihe in dieser Arbeit untersuchter Klasse IV-Mutanten ist (1-37, 1-42, 1-56, 1-624) (H4), ein gleichzeitiges Verschwinden eines weiteren Restriktionsenzyms (z.B. vom Typ I) bei diesen vier unabhängigen Mutationen aber äußerst unwahrscheinlich ist, könnte die Sensitivität dieser Stämme auf der mutationsbedingten Veränderung der Bakterienzellwand beruhen, die zu einer vorher nicht möglichen Anheftung von Ø29 führen würde.

Abgesehen von den Minimaltypstämmen der Klasse I wurden die Rlu-1 I-tragenden Stämme der Klasse IV am häufigsten als Wirte benutzt, nämlich von allen eingesetzten Phagen mit Ausnahme von Ø30. Dabei kam es in allen Fällen zur Restriktion der Phagen-DNA, wobei selbst die mit Sicherheit adsorbierenden eigenen Phagen nach Vermehrung auf Wirten aus anderen Klassen (Ø33/18, Ø33/31, Ø1/31) nur mit einer e.o.p. von etwa 10^{-7} überlebten. Diese Werte, die auch bei Infektion mit anderen Phagen erreicht wurden, liegen zwar im Vergleich mit bekannten R/M-Systemen immer noch sehr niedrig, sind aber im Durchschnitt im mittleren bis unteren Bereich der bei *Rhizobiaceae* beobachteten Werte anzusiedeln und werden dort nur noch von 30- und 31-Stämmen unterboten, was die Effektivität der R/M-Systeme *in-vivo* anbelangt. Dies korreliert zugleich mit der beobachteten Sensitivität von 33- und 1-Stämmen gegenüber sieben von acht eingesetzten Phagen. Die nicht nachweisbare Vermehrung von Ø30 ist daher vermutlich auf fehlende Adsorption dieser Phagen zurückzuführen, zumal in allen Fällen die Restriktion der adsorbierten Phagen (bei e.o.p.-Werten um 10^{-7}) quantitativ erfaßbar war.

Ähnlich den Rme I-tragenden Vertretern der Klasse II besitzt auch der Stamm 29-1 ein sehr wirkungsvolles R/M-System *in-vivo*. Bei klassenfremder DNA-Modifikation (nach Vermehrung auf 18-1, 31-4 oder 32-3) betrug die e.o.p. des eigenen Phagen Ø29 (nunmehr Ø29/18, Ø29/31 bzw. Ø29/32) auf 29-1 nunmehr 10^{-8} bis 10^{-9} . Bezogen auf die beiden aus 29-1 gereinigten und in mancher Hinsicht identischen Endonukleasen läßt sich dieser Befund mit beiden in D.I.3. angesprochenen Modellen

erklären. Er korreliert sowohl mit der Vorstellung zweier in 29-1 enthaltener Typ II-Restriktionsenzyme unterschiedlicher Schnittspezifität (vergleichbar den R/M-Systemen von *A.tumefaciens*) als auch mit der Möglichkeit, daß die "Atu-29 II"-Aktivität lediglich die aktivere Form von Atu-29 I darstellt, da die genannte Enzymaktivität zusammen mit Rle I zu den beiden *in-vitro* aktivsten Restriktionsenzymen des *Rhizobiaceen*-Systems gehört und nahezu jede Plasmid- und Phagen-DNA fremder Herkunft in eine Vielzahl von Fragmenten abbaut. Analog ist zudem die Möglichkeit der Existenz eines zusätzlichen R/M-Systems vom Typ I nicht von der Hand zu weisen.

Die Restriktion der zur Lyse von 29-1 führenden Phagen $\phi 18$ und $\phi 31$ geht aus der im umgekehrten Fall nachgewiesenen Restriktion der Phagen $\phi 29/18$ und $\phi 29/31$ hervor und gilt ziemlich sicher auch für die Vermehrung von $\phi 20$. Daß (im Gegensatz zu $\phi 20$) keinerlei Vermehrung von $\phi 32$ auf 29-1 beobachtet wurde, ist vermutlich ebenfalls auf Restriktion zurückzuführen. Dafür spricht das Vorhandensein der Adsorptionsstelle für $\phi 20$, die auf Restriktion beruhende e.o.p. von $1,9 \times 10^{-9}$ bei der Vermehrung von $\phi 29/32$ auf 29-1 und die Tatsache, daß die Phagen $\phi 20$ und $\phi 32$ ansonsten einheitliches Infektionsverhalten zeigten. Für die fehlende Vermehrung von $\phi 30$ auf 29-1 gelten analoge Betrachtungen wie für *A.tumefaciens*- und *R.meliloti*-Stämme, da wiederum kein Lysat $\phi 29/30$ isoliert und verglichen werden konnte und auch 29-1 ein sehr effektives R/M-System *in-vivo* besitzt. Eine Störung der Adsorption von $\phi 30$ ist aber zu vermuten. Im Fall von 26-1 ist eine eindeutige Begründung für die ausbleibende Vermehrung aller Phagen außer $\phi 33$, $\phi 1$ und $\phi 29$ derzeit nicht möglich, da keine quantitativen Untersuchungen hierzu *in-vivo* vorliegen.

4. BETRACHTUNGEN ZUR EVOLUTION DER R/M-SYSTEME

Die Expression wirtskontrollierter R/M-Systeme zur Abwehr fremder DNA *in-vivo* ist in einfacher Weise von der Evolution der verschiedenen Bakteriensysteme her zu erklären. Indem sie den Genaustausch zwischen verschiedenen mehr oder weniger weit entfernten Bakteriensystemen in einem gegebenen Milieu verhindern, schützen sie den Genbestand des jeweils am besten angepaßten Organismus. Damit beantwortet sich gleichzeitig die Frage nach dem Sinn klassenspezifischer und von Klasse zu Klasse unterschiedlicher R/M-Systeme. Es besteht Grund zur Annahme, daß auch *in-vivo* eine Umstrukturierung des *Rhizobiaceen*-Genoms stattfindet, die möglicherweise in Abhängigkeit von den jeweiligen Umweltbedingungen durch Anschalten des geeignetsten Leserasters zur Ausprägung des am besten angepaßten Phänotyps führt. In diesem Sinn stünde die Ausprägung einer bestimmten DNA-Spezifität in unmittel-

barer Beziehung zur Zusammensetzung der im jeweiligen Milieu vorherrschenden potentiellen Erbinformations-Überträger (Bakterien und Bakteriophagen). Insofern muß das Vorliegen klassenspezifischer R/M-Systeme bei den *Rhizobiaceen* geradezu gefordert werden, soll die Eigenständigkeit jeder einzelnen Klasse nicht auf die Dauer verloren gehen. Dies gilt in gleichem Maße für die Klasse V, für die bislang kein R/M-System nachgewiesen werden konnte. In allen bekannten Fällen erkennen Restriktions- und zugehöriges Modifikationsenzym identische Nukleotidsequenzen (B1, B14, M5, S14). Würden die R/M-Systeme aller fünf Klassen dieselbe Nukleotidfolge erkennen (und methylieren), hätte dies permanenten Genaustausch und damit den Verlust der optimalen Anpassung an die jeweilige Umwelt zur Folge.

Für die Entstehung der unterschiedlichen R/M-Systeme der *Rhizobiaceen* lassen sich zwei gegensätzliche hypothetische Modelle aufstellen. Im ersten Modell wird gefordert, daß bestimmte Streß- (im Labor) bzw. Umweltfaktoren (*in-vivo*) eine Mutation oder Umstrukturierung der für die spezifische Erkennung des jeweiligen Restriktions- und Modifikationsenzym verantwortlichen Gene auslösen. Dies hätte eine Veränderung in der Aminosäuresequenz der betreffenden Polypeptidkette und in seltenen Fällen eine veränderte Struktur ihres aktiven Zentrums zur Folge, was zur spezifischen Bindung an eine neuartige Erkennungssequenz führen würde. Dieses Modell ist wahrscheinlich bei einer Reihe von *E.coli*- und *Salmonella*-Systemen verwirklicht. Die R/M-Systeme dieser Bakterien beinhalten z.T. multifunktionelle (Typ I-) Restriktionsenzyme, die zugleich Modifikationsaktivität besitzen (B7, B10, Y3). Dieser Enzymkomplex wird von einem polycistronischen Operon aus drei Genen kodiert, deren Genprodukte im einzelnen für die Erkennung (DNA-Spezifität), Restriktion oder Modifikation der jeweiligen DNA verantwortlich sind. Zwei Genprodukte bilden jeweils eine funktionelle Restriktions- bzw. Modifikationseinheit, wobei die für die DNA-Erkennung zuständige Untereinheit stets beiden Teilenzymen gemeinsam ist (B11, G2, H12, S2). Dabei stellen die zugrundeliegenden Gene im Fall der R/M-Systeme K, B und A von *E.coli*, des SB-Systems von *Salmonella typhimurium* und des SP-Systems von *S.potsdam* multiple Allele dar, die denselben Genlokus auf den nahezu homologen Chromosomen beider Gattungen besetzen (A9, B2, B15, B17, C7, G2, V2). Durch Komplementationsstudien konnte gezeigt werden, daß sich die Teilfunktionen der Systeme K, B und SB einerseits (A8, B11, G2, V2) sowie SB und SP andererseits (B15) bei Mutation in einem der drei für die Restriktion oder Modifikation essentiellen Gene in vielen Fällen gleichwertig ersetzen können. Die gebildeten Hybridproteine stellen überraschenderweise funktionstüchtige Enzyme dar, die *in-vivo* Phagen-DNA in der gleichen Weise modifizieren oder restringieren wie vorher (A8, B11, B15, B16, G2, V2). Dies führte zur

Hypothese, daß sich alle vier R/M-Systeme von gemeinsamen Genvorfahren ableiten und noch immer umfangreiche Homologie in jenem Teil der für die DNA-Spezifität zuständigen Untereinheit aufweisen, der die Bindungseigenschaften des jeweiligen Enzymkomplexes bestimmt (B16,C6). Aufgrund von Mutations- und Rekombinationsereignissen bestünden jedoch erhebliche Differenzen in jenem engen Abschnitt des Genortes, der die Wechselwirkung mit der jeweiligen Erkennungssequenz bewirkt (B16,C6). Auf die Möglichkeit, durch Mutation im Spezifitätsgen neuartige R/M-Systeme zu erzeugen, wurde erstmals von AREER & LINN (1969) aufmerksam gemacht (A8). Tatsächlich gelang es BULLAS et al. 1976, durch Transduktion eine Rekombination zwischen dem SB-System von *S.typhimurium* und dem SP-System von *S.potsdam* herbeizuführen und dadurch ein neuartiges funktionelles Hybridsystem (SQ) mit gänzlich anderer DNA-Spezifität zu konstruieren (B16).

Bei R/M-Systemen mit Typ II-Restriktionsenzymen, wie sie in dieser Arbeit durchwegs nachgewiesen wurden, stellt sich die Situation jedoch komplizierter dar. Zwar ist über die Genetik dieser R/M-Systeme bis heute so gut wie nichts bekannt (M10), doch stellen die bislang untersuchten Restriktions- und Modifikationsenzyme vom Typ II mit Sicherheit getrennt codierte enzymatische Funktionen dar (G8, M2, M10, N2, W1, Y2), die unterschiedliche Sekundär- und Quartärstruktur und keinerlei gemeinsame Untereinheiten (z.B. für spezifische DNA-Erkennung) besitzen (G8, N2, Y2) und zumindest im Fall von *EcoRI* (M9), evtl. auch *Hpa I* und *Hpa II* (H10, Y1) völlig unterschiedliche Wechselwirkung mit der jeweiligen DNA zeigen. Eine Veränderung der DNA-Spezifität setzt daher in diesem Fall mindestens zwei Mutations-, Rekombinations- oder Umstrukturierungs-Ereignisse voraus, die obendrein zur Erkennung derselben Nukleotidsequenz führen müßte. Die Wahrscheinlichkeit hierfür ist gering. Ein alternatives Modell geht daher davon aus, daß alle R/M-Systeme im jeweiligen *Rhizobiaceen*-Stamm bereits codiert oder zumindest codierbar vorliegen, d.h. ohne weiteres zu einer sinnvollen Genkette zusammengefügt werden können, wobei in Einklang mit der möglichen Bedeutung klassenspezifischer R/M-Systeme in Hinblick auf unterschiedliche Umweltbedingungen (siehe vorher) nur dasjenige oder die beiden R/M-Systeme mit der dem jeweiligen Milieu am besten angepaßten DNA-Spezifität aktiv ist oder sind. Unterstützt wird dieses Modell durch Befunde, die bei *Haemophilus influenzae* Rd gewonnen wurden. Diese ebenfalls mit einer Reihe unterschiedlicher R/M-Systeme ausgestatteten Bakterien zeichnen sich durch die häufige und spontane Segregation von Klonen mit phänotypisch verändertem Restriktions- und Modifikationsverhalten aus (G10). Dabei entstehen aus ursprünglich restriktiven Stämmen Klone, die *in-vivo* den Phagen S2 mit erheblich geringerer Effektivität und z.T. überhaupt nicht mehr restringuieren und umgekehrt aus nichtrestriktiven Kolonien Stämme, die diesen Phagen

nunmehr mit z.T. hoher Effizienz restringieren (G10). Zur Erklärung dieses Phänomens wird u.a. eine Regulation nach Art der bei *Salmonella* verbreiteten Phasenvariation der Geißelantigene vorgeschlagen (S12,S13). Bekanntlich wird die Phasenvariation bei *Salmonella* durch ein ausgeklügeltes System von Transpositionseignissen hervorgerufen (S12,S13). Diese Vorstellung ist auch auf das zuletzt beschriebene Modell übertragbar. Transposonen und IS-Elementen wird auch eine maßgebliche Rolle bei der Genomumstrukturierung der *Rhizobiaceen* zugeschrieben (H8,H9,R10). In gleicher Weise könnte die Regulation aber auch über die Induktion oder reversible Inaktivierung von Repressorproteinen oder Aktivatoren durch bestimmte Umweltfaktoren erfolgen.

5. AUSBLICK

Im Rahmen der modernen Bakterienbiologie spielt die genetische Wechselwirkung zwischen den *Rhizobiaceen* und ihren Wirtspflanzen eine eminent wichtige Rolle, vor allem in Hinblick auf die für die Zukunft der Menschheit zu bewältigenden Probleme. Genetische Manipulationen, die zu höheren Nutzerträgen durch die weltweit angebauten Kulturpflanzen führen, stehen dabei im Vordergrund der Forschung. In diesem Zusammenhang kommt auch der Untersuchung der Restriktions- und Modifikationssysteme der *Rhizobiaceen* und ihrer Abkömmlinge große Bedeutung zu. In einer Reihe von Fällen wurde eine Hemmung des Plasmidtransfers nach verschiedenen *Rhizobiaceen* beobachtet (D2,K11,S18). In der vorliegenden Arbeit wurde bewiesen, daß neben so verbreiteten Phänomenen wie Infertilität oder Inkompatibilität insbesondere die generelle Verbreitung von *in-vivo* höchst effektiven R/M-Systemen hierfür ursächlich ist. Zur Übertragung von Genen, die zu einer effizienteren N_2 -Reduktion durch die *Rhizobium*-Zelle führen, bedarf es der Ausschaltung solcher Restriktionsenzyme. Dies scheint möglich über die Isolierung und Charakterisierung der entsprechenden Methylasen oder über die Erzeugung restriktionsdefekter Mutanten. Da dem RP4-Faktor und den davon abgeleiteten Plasmiden aufgrund ihres großen Wirtsbereichs - sie lassen sich auf alle gramnegativen Bakterien übertragen (D2) - dabei eine bedeutende Rolle als möglichen Vektoren des Centransfers zukommt, dürfte die Tatsache einer *in-vitro* Restriktion dieser Plasmide durch *Rhizobium*-spezifische Enzyme von großer Wichtigkeit sein. In Hinblick auf die Übertragung und Expression bakteriellen Erbguts in Pflanzen (via T-DNA) ist ferner eine Kenntnis der Eigenschaften der *Agrobacterium*-spezifischen Restriktionsenzyme vonnöten.

Eine der vorrangigen Aufgaben der nächsten Zeit liegt in der Untersuchung der R/M-Systeme weiterer Vertreter der *Rhizobiaceen in-vivo* und *in-vitro*. Dies gilt

in besonderem Maße für die roten Carotinoidstämme der Klasse V, für die bis heute weder sequenzspezifische Restriktionsenzyme noch wirtsspezifische Phagen isoliert werden konnten. Hinsichtlich der Klasse III stellen die biochemische Aufklärung des *in-vivo* nachgewiesenen R/M-Systems mit Hilfe der zu isolierenden Restriktionsendonuklease(n) und die bereits begonnene morphologische und molekularbiologische Charakterisierung des neugewonnenen Phagen Ø30 vorrangige Aufgabenfelder in naher Zukunft dar. Daneben stellt die Ermittlung der Erkennungssequenz der bereits gereinigten Restriktionsenzyme eines der wichtigsten Forschungsziele im absehbaren Zeitraum dar. Von diesen Endonukleasen ist derzeit nur die Erkennungssequenz von Rlu-1 I bekannt (R7,S11). Die bis heute veröffentlichten Restriktionsenzyme erkennen fast ausnahmslos palindrome Nukleotidsequenzen (M10,R3). Da mittlerweile die vollständige Basensequenz einer Vielzahl von Virus- (R1), Phagen- (B6,G5,S5,S6,V3) und Plasmid-DNA-Species (O1,S23) aufgeklärt ist und alle darin enthaltenen palindromen Nukleotidsequenzen nunmehr datenmäßig gespeichert vorliegen (E1,F3), bietet sich hier eine Computeranalyse nach FUCHS et al. an (F3), die über die Zahl der entstandenen Fragmente und die zugehörige Anzahl palindromer Basensequenzen die jeweilige Erkennungssequenz ermittelt. Erst wenn sich eine solche Analyse als nicht möglich erweisen sollte oder zu deren Ergänzung (Ermittlung der Schnittstelle), sollte eine umfangreiche und zeitraubende Sequenzbestimmung nach herkömmlicher Methode (M4,S4) durchgeführt werden.

Der breite Wirtsbereich der *Rhizobiaceen*-spezifischen Phagen ist von großer Bedeutung für den Nachweis der Verwandtschaft der einzelnen Klassen im Genomumstrukturierungs-Schema von HEUMANN (H9). Erstmals stehen damit einfach nachzuweisende genetische Marker zur Verfügung, die im Verlauf der Konversion zu Stämmen anderer Klassenzugehörigkeit im Vergleich zum Ausgangsstamm nahezu unverändert erhalten bleiben. Mit Hilfe der klonierten Gene für die einzelnen Phagenrezeptorstellen als Hybridprobe sollte es möglich sein, Gensequenzen des ursprünglichen Stammes in den umgewandelten Stämmen wiederzufinden, um damit die genetische Grundlage der Versatilität der R/M-Systeme der *Rhizobiaceen* zu verstehen.

ANHANG I : Abbildungen zur Restriktionsanalyse in-vitro

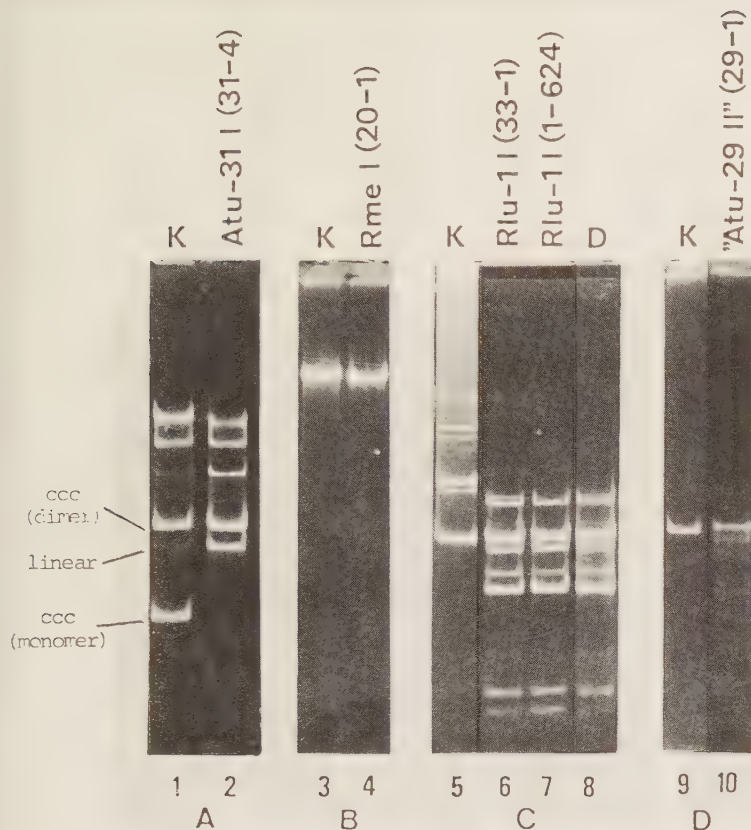


Abb.2 DNA-Spezifität der gereinigten Restriktionsenzyme:
Verdauung von pMB9-DNA

EcoRI-linearisierte (Bahnen 3,4,9 und 10) oder unbehandelte pMB9-Plasmid-DNA (übrige Bahnen) wurde unter Standardbedingungen mit der jeweiligen Enzympräparation 1 Std. bei 37°C verdaut. Zusätzlich wurde eine Doppelverdauung mit den beiden aus 33-1 und 1-624 gereinigten Restriktionsenzymen (Rlu-1 I) durchgeführt (in Bahn 8 mit D bezeichnet), wobei beide Einzelspaltungen unter Rlu-1 I-Standardbedingungen erfolgten. K ist die enzymfreie DNA-Kontrolle. Die über der Bande der dimeren ccc-Form in Gel A und C lokalisierten Bänder entsprechen oligomeren Molekülformen, die auf die DNA-Präparation durch Chloramphenicol-Verstärkung zurückzuführen sind.

Gelbedingungen: Gel A: 0,7% Agarose, 25 V, 15 Std., Gel B: 0,7% Agarose, 25 V, 12 Std., Gel C: 1% Agarose, 80 V, 3 Std., Gel D: 0,7% Agarose, 80 V, 3 Std.

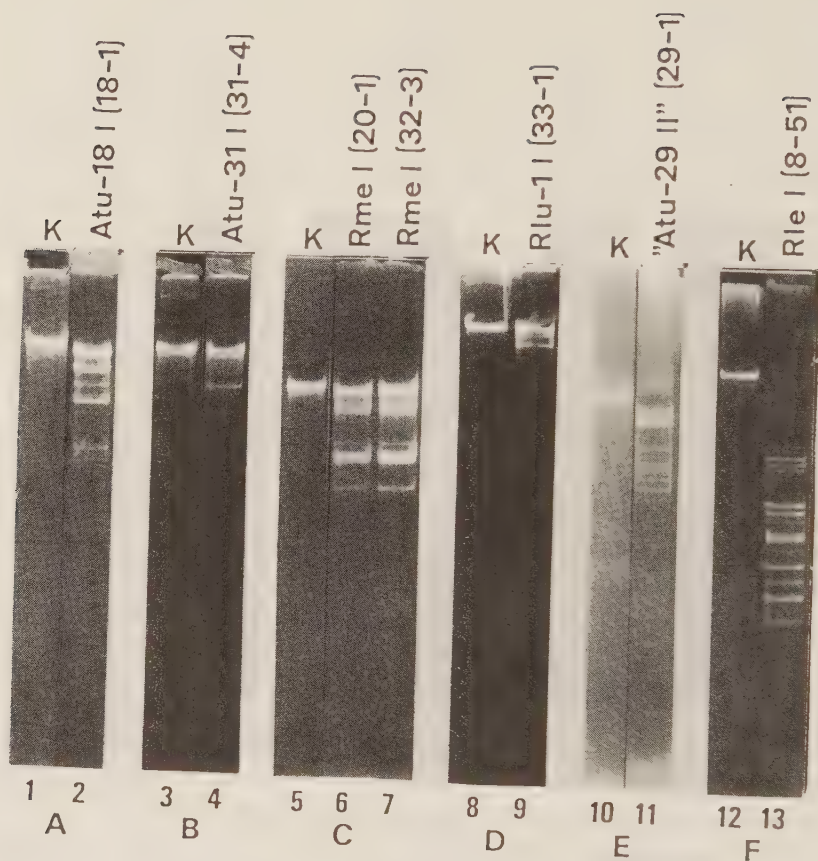


Abb.3 DNA-Spezifität der gereinigten Restriktionsenzyme:
Verdauung von λ -DNA

λ -DNA wurde unter Standardbedingungen mit der jeweiligen Enzympräparation 1 Std. bei 37°C verdaut. K ist die enzymfreie DNA-Kontrolle.

Gelbedingungen: Gel A: 0,7% Agarose, 25 V, 13 Std., Gel B: 0,8% Agarose, 25 V, 14 Std., Gel C: 0,6% Agarose, 80 V, 2,5 Std., Gel D: 0,8% Agarose, 25 V, 12 Std., Gel E: 0,7% Agarose, 80 V, 2,5 Std., Gel F: 0,8% Agarose, 25 V, 16 Std.

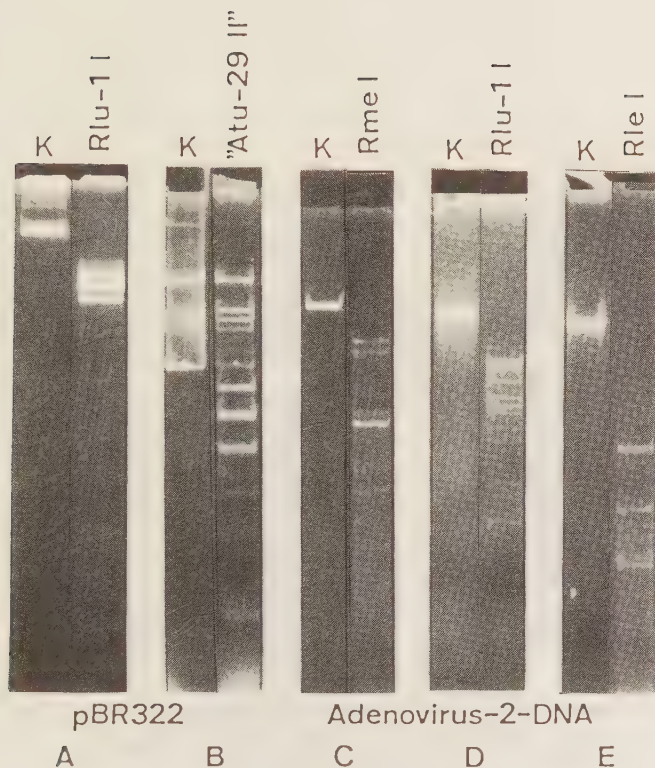
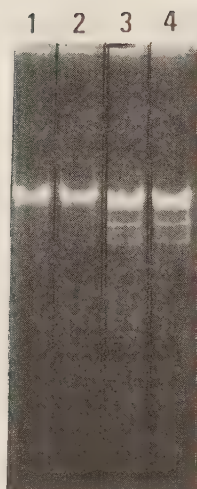


Abb.4 DNA-Spezifität der gereinigten Restriktionsenzyme:

Verdauung von pBR322- und Adenovirus-2-DNA

pBR322- und Adenovirus-2-DNA wurden unter Standardbedingungen mit der jeweiligen Enzympräparation 1 Std. bei 37°C verdaut. K ist die enzymfreie DNA-Kontrolle. Die in Gel A und B über der Bande der dimeren ccc-Form (vergleiche Abb.2) lokalisierten Banden entsprechen oligomeren Molekülformen, die auf die DNA-Präparation durch Chloramphenicol-Verstärkung zurückzuführen sind.

Gelbedingungen: Gel A: 2,5% Agarose, 25 V, 16 Std., Gel B bis E: jeweils 0,8% Agarose, Gel B: 80 V, 2 Std., Gel C: 25 V, 15 Std., Gel D: 80 V, 2,5 Std., Gel E: 80 V, 3 Std.



Bahn 1: Atu-29 I, 75 mM NaCl

Bahn 2: Atu-29 I, 75 mM NaCl
 + "Atu-29 II", 75 mM KCl

Bahn 3: "Atu-29 II", 20 mM KCl

Bahn 4: Atu-29 I, 75 mM NaCl
 + "Atu-29 II", 20 mM KCl

Abb. 5 DNA-Spezifität der Restriktionsenzyme aus 29-1:
Spaltmuster von λ -DNA bei Einfach- und Doppelver-
dauung

λ -DNA wurde sowohl unter Atu-29 I- (75 mM Salz im Rkt.ansatz) als auch unter "Atu-29 II"-Standardbedingungen (75 mM Salz im Rkt.ansatz) mit den beiden aus 29-1 gereinigten Restriktionsenzymen 1 Std. bei 37°C verdaut. Außerdem wurden Doppelverdauungen mit beiden Enzymen durchgeführt, wobei die Einzelverdauung mit Atu-29 I stets unter Standardbedingungen, die Einzelverdauung mit der "Atu-29 II"-Aktivität aber unter beiden genannten Bedingungen erfolgte.

Gelbedingungen: 0,5% Agarose, 25 V, 16 Std.

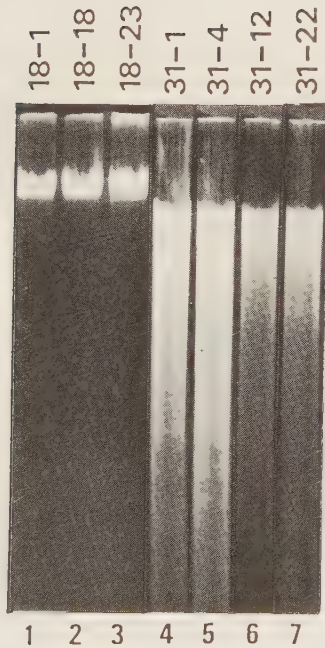


Abb.6 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:
Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit Atu-18 I
Gesamt-DNA aus Bakterien der Klasse I (Minimaltyp
und *A.tumefaciens*-Wildtyp) wurde unter Standard-
bedingungen mit Atu-18 I (aus 18-1) 2 Std. bei
37°C verdaut.
Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 25 V, 15 Std.

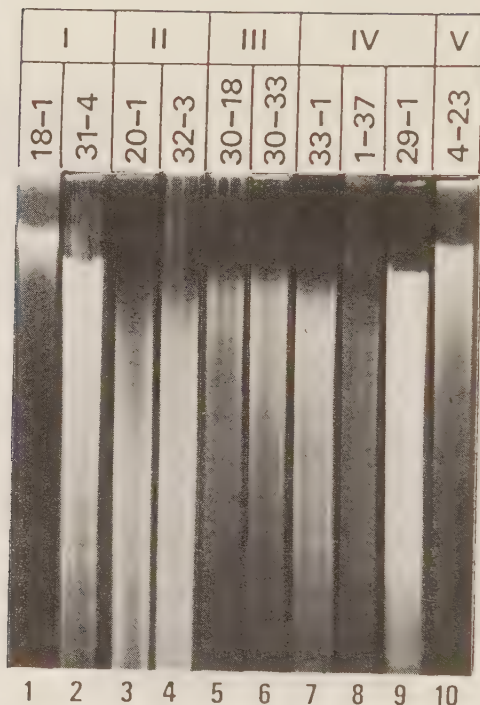


Abb. 7 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit Atu-18 I

Bakterielle Gesamt-DNA aus den fünf Klassen des Konversionsschemas wurde unter Standardbedingungen mit Atu-18 I (aus 18-1) 2 Std. bei 37°C verdaut. Die römischen Zahlzeichen über den Gelbahnen bezeichnen die Zugehörigkeit zur jeweiligen Klasse.

Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 25 V, 14 Std.

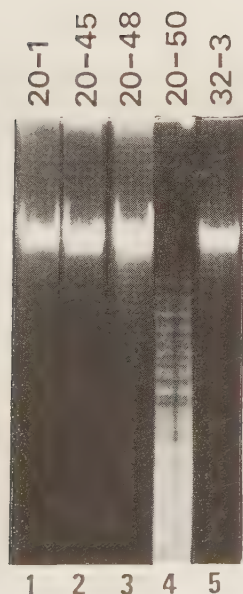


Abb. 8 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit Rne I

Gesamt-DNA aus Bakterien der Klasse II (*R.meli-*
loti-Wildtyp und Prowildtyp wurde unter Stan-
dardbedingungen mit Rne I (aus 20-1) 2 Std. bei
37°C verdaut.

Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 25 V, 16 Std.

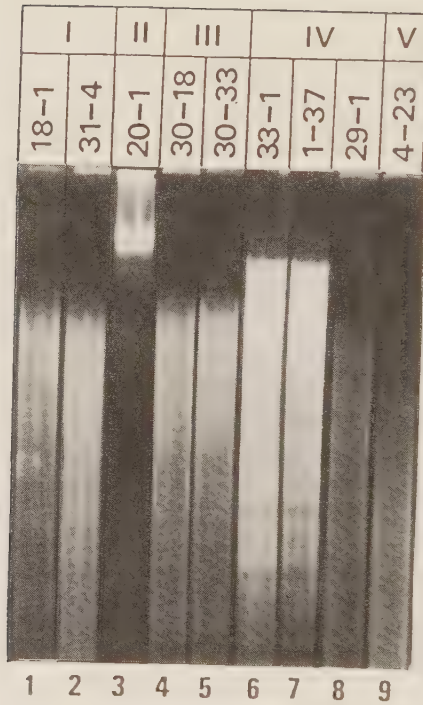


Abb. 9 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit Rme I

Bakterielle Gesamt-DNA aus den fünf Klassen des Konversionsschemas wurde unter Standardbedingungen mit Rme I (aus 20-1) 2 Std. bei 37°C verdaut. Die römischen Zahlzeichen über den Gelbahnen bezeichnen die Zugehörigkeit zur jeweiligen Klasse.

Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 25 V, 15 Std.

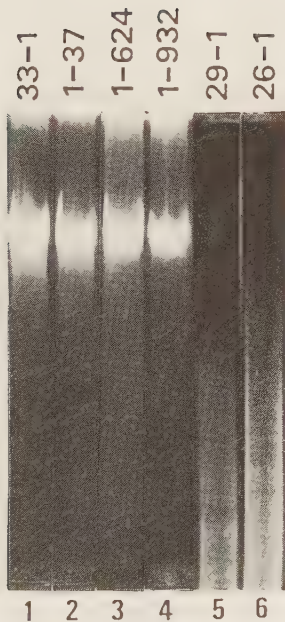


Abb. 10 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit Rlu-1 I

Gesamt-DNA aus Bakterien der Klasse IV (gelber Car-Typ) wurde unter Standardbedingungen mit Rlu-1 I (aus 33-1) 2 Std. bei 37°C verdaut.

Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 25 V, 16 Std.

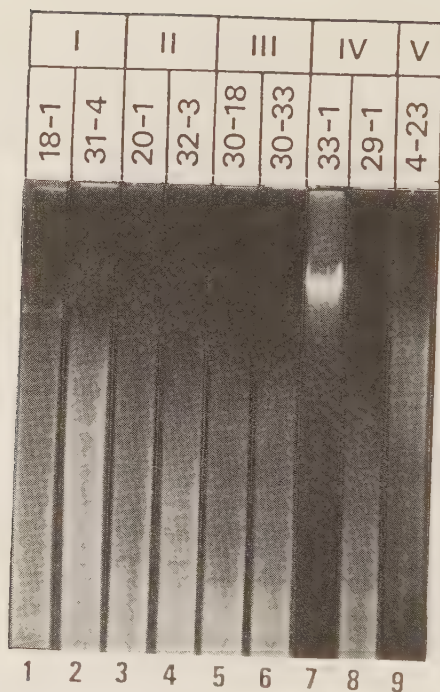


Abb. 11 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit Rlu-1 I

Bakterielle Gesamt-DNA aus den fünf Klassen des Konversionsschemas wurde unter Standardbedingungen mit Rlu-1 I (aus 33-1) 2 Std. bei 37°C verdaut. Die römischen Zahlzeichen über den Gelbahnen bezeichnen die Zugehörigkeit zur jeweiligen Klasse.

Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 25 V, 16 Std.



Abb.12 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit der
"Atu-29 II"-Aktivität

Gesamt-DNA aus Bakterien der Klasse IV (gel-
ber Car-Typ) wurde unter Standardbedingungen
mit der "Atu-29 II"-Aktivität (aus 29-1)
2 Std. bei 37°C verdaut.

Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 35 V, 16 Std.

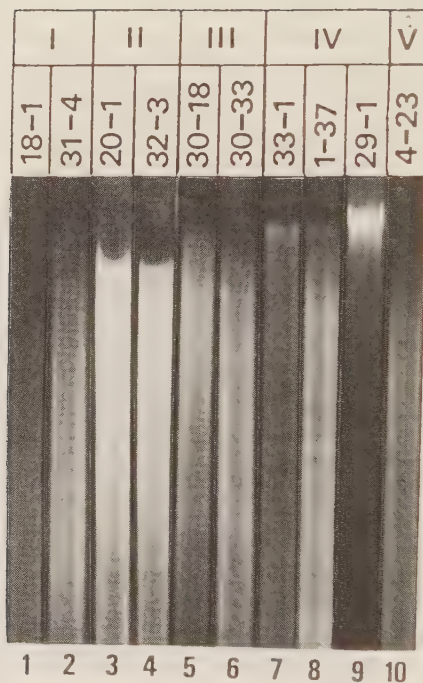


Abb.13 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von bakterieller Gesamt-DNA mit der "Atu-29 II"-Aktivität

Bakterielle Gesamt-DNA aus den fünf Klassen des Konversionsschemas wurde unter Standardbedingungen mit der "Atu-29 II"-Aktivität (aus 29-1) 2 Std. bei 37°C verdaut. Die römischen Zahlzeichen über den Gelbahnen bezeichnen die Zugehörigkeit zur jeweiligen Klasse.

Gelbedingungen: 0,8% Agarose, 35 V, 16 Std.

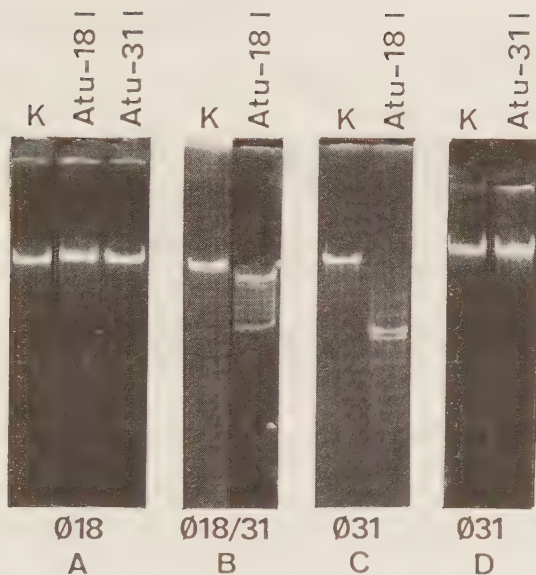


Abb.14 Wirtskontrollierte DNA-Modifikation:

Spaltung von Phagen-DNA mit Atu-18 I und Atu-31 I

DNA der für die Klasse I spezifischen Phagen Ø18 (aus 18-1), Ø18/31 (aus 31-4) und Ø31 (aus 31-4) wurde unter Standardbedingungen mit Atu-18 I (aus 18-1) oder Atu-31 I (aus 31-4) 1 Std. bei 37°C verdaut. K ist die enzymfreie DNA-Kontrolle.

Gelbedingungen: jeweils 0,7% Agarose, Gel A: 25 V, 15 Std., Gel B: 80 V, 3 Std., Gel C: 25 V, 15 Std., Gel D: 25 V, 14 Std.

ANHANG II : Literaturverzeichnis

- A 1 M.H.Adams
Bacteriophages
Interscience Publishers Inc., New York (1959)
- A 2 P.Ambrosius, Diplomarbeit (1983), in Vorbereitung
- A 3 E.S.Anderson, E.J.Threlfall, J.M.Carr und L.G.Savoy
Bacteriophage Restriction in Salmonella typhimurium by R Factors and
Transfer Factors
J.Hyg.Camb. 71, 619 (1973)
- A 4 T.Arai und T.Aoki
New R Plasmid-Mediated Restriction-Modification Systems of Deoxyribo-
nucleic Acid Conferred by Group E R Plasmids
J.Bact. 130, 529 (1977)
- A 5 W.Arber
Host-Controlled Modification of Bacteriophage
Ann.Rev.Microbiol. 19, 365 (1965)
- A 6 W.Arber
Host Specificity of DNA Produced by Escherichia coli
V. The Role of Methionine in the Production of Host Specificity
J.Mol.Biol. 11, 247 (1965)
- A 7 W.Arber
Restriktionsendonukleasen
Angew.Chemie 90, 79 (1978)
- A 8 W.Arber und S.Linn
DNA Modification and Restriction
Ann.Rev.Biochem. 38, 467 (1969)
- A 9 W.Arber und D.Wauters-Willems
Host Specificity of DNA Produced by Escherichia coli
XII. The Two Restriction and Modification Systems of Strain 15T⁻
Mol.Gen.Genet. 108, 203 (1970)
- B 1 B.Bächi, J.Reiser und V.Pirrotta
Methylation and Cleavage Sequences of the EcoP1 Restriction-Modification
Enzyme
J.Mol.Biol. 128, 143 (1979)
- B 2 B.J.Bachman und K.B.Low
Linkage Map of Escherichia coli K12
Microbiol.Rev. 44, 1 (1980)
- B 3 D.Bannister und S.W.Glover
The Isolation and Properties of Two Different Host Specificities
Associated with Drug Resistance Factors
J.Gen.Microbiol. 61, 63 (1970)
- B 4 I.Bauer
Genomstrukturierung bei Rhizobiaceae
Diplomarbeit, Universität Erlangen (1981)

- B 1 R.E.Beardsley
Lysogenicity in *Agrobacterium tumefaciens*
J.Bact. 80, 180 (1960)
- B 6 E.Beck, R.Sonner, E.A.Auerswald, C.Kurz, B.Zirk, G.Osterburg, H.Schaller,
K.Suginoto, H.Sugisaki, T.Okamoto und M.Takanami
Nucleotide Sequence of Bacteriophage fd DNA
Nucl.Acids Res. 5, 4495 (1978)
- B 7 T.A.Bickle
The ATP-Dependent Restriction Endonucleases
in: Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1982)
- B 8 J.P.Boussemaer, P.P.Schrauwen, J.L.Sourrouille und P.Guy
Multiple Modification/Restriction Systems in Lactic Streptococci and
Their Significance in Defining a Phage-Typing System
J.Dairy Res. 47, 401 (1980)
- B 9 R.J.Boyd, A.C.Hildebrandt und N.O.Allen
Specificity Patterns of *Agrobacterium tumefaciens* Phages
Arch.Mikrobiol. 73, 324 (1970)
- B10 H.W.Boyer
DNA Restriction and Modification Mechanisms in Bacteria
Ann.Rev.Microbiol. 25, 153 (1971)
- B11 H.W.Boyer und D.Roulland-Dussoix
A Complementation Analysis of the Restriction and Modification of DNA
in *Escherichia coli*
J.Mol.Biol. 41, 459 (1969)
- B12 ERL Bethesda Research Laboratories
Catalog 1981/1982
Bethesda Research Laboratories Inc., Rockville, U.S.A.
- B13 S.Bron, K.Murray und T.A.Trautner
Restriction and Modification in *Bacillus subtilis*
Purification and General Properties of a Restriction Endonuclease from
Strain R
Mol.Gen.Genet. 143, 13 (1975)
- B14 J.E.Brooks und R.J.Roberts
Modification Profiles of Bacterial Genomes
Nucl.Acids Res. 10, 913 (1982)
- B15 L.R.Bullas und C.Colson
DNA Restriction and Modification Systems in *Salmonella*
III. SP, a *Salmonella potsdam* System Allelic to the SB System in
Salmonella typhimurium
Mol.Gen.Genet. 139, 177 (1975)
- B16 L.R.Bullas, C.Colson und A.Van Pel
DNA Restriction and Modification Systems in *Salmonella*
SQ, a New System Derived by Recombination between the SB System of
Salmonella typhimurium and the SP System of *Salmonella potsdam*
J.Gen.Microbiol. 95, 166 (1976)

- B17 L.R.Bullas, C.Colson und B.Neufeld
Deoxyribonucleic Acid Restriction and Modification Systems in Salmonella:
Chromosomally Located Systems of Different Serotypes
J.Bact. 141, 275 (1980)
- C 1 S.Chang und S.N.Cohen
In vivo Site-Specific Genetic Recombination Promoted by the EcoRI
Restriction Endonuclease
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74, 4811 (1977)
- C 2 K.F.Chater und L.C.Wilde
Restriction of a Bacteriophage of Streptomyces albus G Involving
Endonuclease Sal I
J.Bact. 128, 644 (1976)
- C 3 K.F.Chater und A.T.Carter
Restriction of a Bacteriophage in Streptomyces albus P (CM 52766) by
Endonuclease SalPI
J.Gen.Microbiol. 109, 181 (1978)
- C 4 K.F.Chater und L.C.Wilde
Streptomyces albus G Mutants Defective in the SalGI Restriction-
Modification System
J.Gen.Microbiol. 116, 323 (1980)
- C 5 P.K.Chen
Characterization of Phages of the Crown Gall Bacteria Agrobacterium
tumefaciens [(SMITH and TOWNSEND)] CONN
Ph.D.thesis, University of Wisconsin, Madison (1962)
- C 6 C.Colson und A.M.Colson
A New Salmonella typhimurium DNA Host Specificity
J.Gen.Microbiol. 69, 345 (1971)
- C 7 C.Colson und A.Van Pel
DNA Restriction and Modification Systems in Salmonella
I. SA and SB, Two Salmonella typhimurium Systems Determined by Genes
with a Chromosomal Location Comparable to that of the Escherichia
coli hsd Genes
Mol.Gen.Genet. 129, 325 (1974)
- C 8 D.G.Comb und G.Wilson, unveröffentlichte Ergebnisse
- C 9 H.J.Conn, E.J.Bottcher und C.Randall
The Value of Bacteriophage in Classifying Certain Soil Bacteria
J.Bact. 49, 359 (1945)
- D 1 K.J.Danna und D.Nathans
Specific Cleavage of Simian Virus 40 DNA by Restriction Endonuclease
of Haemophilus influenzae
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 68, 2913 (1971)
- D 2 N.Datta, R.W.Hedges, E.J.Shaw, R.B.Sykes und M.H.Richmond
Properties of an R-Factor from Pseudomonas aeruginosa
J.Bact. 108, 1244 (1971)
- E 1 F.G.HENRIE
The Bacteriophage and Its Behavior
Williams and Wilkins, Baltimore (1926)

- D 4 G.Ditta, S.Stanfield, D.Corbin und D.R.Helinski
Construction of a Gene Bank of *Rhizobium meliloti*
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 77, 7847 (1980)
- D 5 A.Dugaiczky, H.W.Boyer und H.M.Cookman
Ligation of EcoRI Endonuclease-Generated DNA Fragments into Linear
and Circular Structures
J.Mol.Biol. 96, 171 (1975)
- D 6 M.G.C.Duyvesteyn, J.Korsuize, A.De Waard, A.Vonshak und C.P.Wolk
Sequence-Specific Endonucleases in Strains of *Anabaena* and *Nostoc*
Arch.Mikrobiol. 134, 276 (1983)
- E 1 EMBO European Molecular Biology Organization
Nucleotide Sequence Data Library News, 2nd Issue
European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg (1983)
- E 2 S.A.Endow und R.J.Roberts
Two Restriction-Like Enzymes from *Xanthomonas malvacearum*
J.Mol.Biol. 112, 521 (1977)
- F 1 G.F.Fitzgerald, C.Daly, L.R.Brown und T.R.Gingeras
ScrFI: A New Sequence-Specific Endonuclease from *Streptococcus cremoris*
Nucl.Acids Res. 10, 8171 (1982)
- F 2 F.Flett, S.F.Wotton und R.Kirby
A Common Host Specificity in the Restriction and Modification of a
Bacteriophage by Three Distinct *Streptomyces* Species
J.Gen.Microbiol. 110, 465 (1979)
- F 3 C.Fuchs, E.C.Rosenvold, A.Honigman und W.Szybalski
Identification of Palindromic Sequences Recognized by Restriction
Endonucleases as Based on the Tabularized Sequencing Data for Seven
Viral and Plasmid DNAs
Gene 10, 357 (1980)
- G 1 L.I.Glatman, A.F.Moroz, M.B.Yablokova, B.A.Rebentish und G.V.Kholmina
A Novel Plasmid-Mediated DNA Restriction-Modification System in
Escherichia coli
Plasmid 4, 350 (1980)
- G 2 S.W.Glover
Functional Analysis of Host Specificity Mutants in *Escherichia coli*
Genet.Res. 13, 227 (1970)
- G 3 S.W.Glover, J.Schell, N.Symonds und K.A.Stacey
The Control of Host-Induced Modification by Phage P1
Genet.Res. 4, 138 (1963)
- G 4 S.W.Glover und A.Piekarowicz
Host Specificity of DNA in *Haemophilus influenzae*:
Restriction and Modification in Strain Rd
Biochem.Biophys.Res.Comm. 46, 1610 (1972)
- G 5 G.N.Godson, B.G.Barrell, P.Staden und J.C.Fiddes
Nucleotide Sequence of Bacteriophage G4 DNA
Nature 276, 236 (1978)

- C 6 S.H.Goodgal und R.Gromkova
On the Role of Restriction Enzymes of *Haemophilus influenzae* in Transformation and Transfection
Abstracts of the 2nd European Meeting on Transformation and Transfection in Microorganisms, Krakau (1974)
- G 7 P.J.Greene, H.L.Heynecker, F.Bolivar, R.L.Rodriguez, M.C.Betlach, A.A.Covarrubias, K.Backman, D.J.Russel, R.Tait und H.W.Boyer
A General Method for the Purification of Restriction Enzymes
Nucl.Acids Res. 5, 2373 (1978)
- G 8 P.J.Greene, M.Gupta, H.W.Boyer, W.E.Brown und J.M.Rosenberg
Sequence Analysis of the DNA Encoding *EcoRI* Endonuclease and Methylase
J.Biol.Chem. 256, 2143 (1981)
- G 9 E.Greiner
Isolierung und Charakterisierung der Plasmide freilebend Stickstoff fixierender Rhizobien
Diplomarbeit, Universität Erlangen (1983)
- G10 R.Gromkova, J.Bendler und S.H.Goodgal
Restriction and Modification of Bacteriophage S2 in *Haemophilus influenzae*
J.Bact. 114, 1151 (1973)
- G11 R.Gromkova und S.H.Goodgal
Biological Properties of a *Haemophilus influenzae* Restriction Enzyme, Hind I
J.Bact. 127, 848 (1976)
- G12 L.Guarente, T.M.Roberts und M.Ptashne
A Technique for Expressing Eukaryotic Genes in Bacteria
Science 209, 1428 (1980)
- H 1 A.Haberman
The Bacteriophage P1 Restriction Endonuclease
J.Mol.Biol. 89, 545 (1974)
- H 2 W.Heumann
Kreuzungsversuche mit sternbildenden Bakterien
Arch.Mikrobiol. 36, 244 (1960)
- H 3 W.Heumann
Die Methodik der Kreuzung sternbildender Bakterien
Biol.Zbl. 81, 341 (1962)
- H 4 W.Heumann
Conjugation in Starforming *Rhizobium lupini*
Mol.Gen.Genet. 102, 132 (1968)
- H 5 W.Heumann
Rhizobium lupini Genetics
Curr.Top.Microbiol.Immunol. 88, 1 (1979)
- H 6 W.Heumann
Rhizobium Genetics
In: *Biology of Inorganic Nitrogen and Sulfur* (Herausgeber H.Böthe und A.Trebst) S.384, Springer-Verlag, Berlin und Heidelberg (1981)

- H 7 W.Heumann
Genome Rearrangement of the Rhizobiaceae
Abstracts of Papers Presented at the 38th Meeting of the Deutsche
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen, 5.-8.10.1981
Zbl.Bakt.Hyg. 1, Abt.Orig.C 3, 556 (1982)
- H 8 W.Heumann
Genomstrukturierung der Rhizobiaceae
Symposium, Institut für Mikrobiologie und Biochemie, Universität
Erlangen, 18.-20.2.1982
- H 9 W.Heumann, B.Merkt, A.Rösch, R.Springer, B.Rüger, D.Horn, I.Bauer,
K.Winkler und E.Wagner
Genome Rearrangement of the Rhizobiaceae
In: Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction (Herausgeber
A.Pühler) S.373, Springer-Verlag, Berlin und Heidelberg (1983)
- H10 J.L.Hines und K.L.Agarwal
Purification of Hpa I and Hpa II
Fed.Proc. 38, 294 (1979)
- H11 R.A.Hitzeman, D.W.Leung, L.J.Pery, W.J.Kohr, H.L.Levine und
D.V.Goeddel
Secretion of Human Interferons by Yeast
Science 219, 620 (1983)
- H12 J.Hubacek und S.W.Glover
Complementation Analysis of Temperature-Sensitive Host Specificity
Mutations in Escherichia coli
J.Mol.Biol. 5, 111 (1970)
- I 1 S.Ikawa, T.Shibata und T.Ando
Host-Controlled Modification and Restriction in Bacillus subtilis
Bsu 168-System and BsuR-System in B.subtilis 168
Mol.Gen.Genet. 170, 123 (1979)
- I 2 S.Iordanescu und M.Surdeanu
Two Restriction and Modification Systems in Staphylococcus aureus
NCTC8325
J.Gen.Microbiol. 96, 277 (1976)
- J 1 G.A.Jacoby und L.Sutton
Restriction-Modification Systems Determined by Pseudomonas Plasmids
Plasmid 8, 141 (1982)
- J 2 I.S.Johnson
Human Insulin from Recombinant DNA Technology
Science 219, 632 (1983)
- K 1 L.Kauc und A.Piekarowicz
Purification and Properties of a New Restriction Endonuclease from
Haemophilus influenzae Pf
Eur.J.Biochem. 92, 417 (1978)
- K 2 S.Klaus, M.Hartmann, H.Kriegel, M.Poth, F.Walter und Y.I.Pautenstein
Restriction of Streptomyces Phage S115 by Endonuclease Shy I from
Streptomyces hygroscopicus 0477
Mol.Gen.Genet. 184, 286 (1981)

- K 4 H.Kleinig, W.Heumann, W.Meister und G.Englert
X. Carotenoids of Rhizobia
I. New Carotenoids from Rhizobium lupini
Helvetica Chimica Acta 60, 254 (1977)
- K 4 H.Kleinig, R.Schmitt, W.Meister, G.Englert und H.Thommen
New C₃₀-Carotenoid Acid Glucosyl Esters from Pseudomonas rhodes
Z.Naturforsch. 34c, 181 (1979)
- K 5 H.Kleinig und W.J.Broughton
Carotenoid Pigments in a Red Strain of Rhizobium from Lotononis
bainesii Baker
Arch.Mikrobiol. 133, 164 (1982)
- K 6 V.G.Kosykh, Y.I.Buryanov und A.A.Bayev
Molecular Cloning of EcoRII Endonuclease and Methylase Genes
Mol.Gen.Genet. 178, 717 (1980)
- K 7 D.H.Krüger, S.Hansen, C.Schroeder und W.Presber
Host-Dependent Modification of Bacteriophage T7 and SAMase Negative
T3-Derivatives Affecting Their Adsorption Ability
Mol.Gen.Genet. 153, 107 (1977)
- K 8 D.H.Krüger, S.Hansen und C.Schroeder
Host-Dependent Modification of Bacterial Virus T3 Affecting Its
Adsorption Ability
Virology 102, 444 (1980)
- K 9 D.H.Krüger, M.Reuter, S.Hansen und C.Schroeder
Influence of Phage T3 and T7 Gene Functions on a Type III (EcoP1) DNA
Restriction-Modification System in vivo
Mol.Gen.Genet. 185, 457 (1982)
- K10 U.Kühnlein und W.Arber
Host Specificity of DNA Produced by Escherichia coli
XV. The Role of Nucleotide Methylation in in vitro B-Specific
Modification
J.Mol.Biol. 63, 9 (1972)
- K11 L.D.Kuykendall
Transfer of R-Factors to and between Genetically Marked Sublines of
Rhizobium japonicum
Appl.Envir.Microbiol. 37, 862 (1979)
- L 1 S.Lacks und B.Greenberg
Complementary Specificity of Restriction Endonucleases of Diplococcus
pneumoniae with Respect to DNA Methylation
J.Mol.Biol. 114, 153 (1977)
- L 2 E.Layne
Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins
Methods in Enzymology III, 447 (1957)
- L 3 J.M.Lebon, C.I.Kado, L.J.Rosenthal und J.G.Chirikjian
DNA Modifying Enzymes of Agrobacterium tumefaciens:
Effect of DNA Topoisomerase, Restriction Endonuclease, and Unique
DNA Endonuclease on Plasmid and Plant DNA
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 75, 4097 (1978)

- L 4 S.Lederberg
Suppression of the Multiplication of Heterologous Bacteriophages in
lysogenic Bacteria
Virology 3, 496 (1957)
- L 5 S.M.Lesley
A Bacteriophage Typing System for Rhizobium meliloti
Can.J.Microbiol. 28, 180 (1982)
- M 1 A.D.B.Malcolm
The Use of Restriction Enzymes in Genetic Engineering
in: Genetic Engineering, Vol. 2
Academic Press Inc., London (1981)
- M 2 M.B.Mann, R.N.Rao und H.O.Smith
Cloning of Restriction and Modification Genes in E.coli:
The Hha II System from Haemophilus haemolyticus
Gene 3, 97 (1978)
- M 3 M.G.Masucci, R.Szigeti, E.Klein, G.Klein, J.Gruet, L.Montagnier,
H.Taiha, A.Hull, S.Nagata und C.Weissmann
Effect of Interferon- α 1 from E.coli on Some Cell Functions
Science 209, 1431 (1980)
- M 4 A.M.Maxam und W.A.Gilbert
A New Method for Sequencing DNA
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 74, 560 (1977)
- M 5 M.McClelland
The Effect of Sequence-Specific DNA Methylation on Restriction
Endonuclease Cleaving
Nucl.Acids Res. 9, 5859 (1981)
- M 6 J.E.Mertz und R.W.Davis
Cleavage of DNA by Restriction Endonuclease Generates Cohesive Ends
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 69, 3370 (1972)
- M 7 M.Neselson und P.Yuan
DNA Restriction Enzyme from E.coli
Nature 217, 1110 (1968)
- M 8 C.Miller und S.N.Cohen
Phenotypically Cryptic EcoRI Endonuclease Activity Specified by the
ColE1 Plasmid
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 75, 1265 (1978)
- M 9 P.Modrich und R.A.Rubin
Role of the 2-Amino Group of Deoxyguanosine in Sequence Recognition by
EcoRI Restriction and Modification Enzymes
J.Biol.Chem. 252, 7273 (1977)
- M10 P.Modrich und R.J.Roberts
Type-II Restriction and Modification Enzymes
in: Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1982)
- M11 K.Murray und N.L.Murray
Manipulation of Restriction Targets on Phage Lambda to Form Recombi-
nations for DNA Fragments
Nature 251, 476 (1974)

- M 1 A.Murray, N.E.Murray und W.J.Brammar
Restriction Enzymes and the Cloning of Eukaryotic DNA
FEBS Symp. 10, 193 (1975)
- M 2 M.Nathans und H.O.Smith
Restriction Endonucleases in the Analysis and Restructuring of DNA
Molecules
Ann.Rev.Biochem. 4, 123 (1976)
- N 2 A.K.Newman, R.A.Rubin, S.H.Kim und P.Modrich
DNA Sequences of Structural Genes for EcoRI DNA Restriction and
Modification Enzymes
J.Biol.Chem. 256, 2131 (1981)
- N 3 D.O.Norris
A Red Strain of *Phizobium* from *Lotononis bainesii* Baker
Aust.J.Agric.Res. 9, 629 (1958)
- N 4 R.C.Nowinski, M.R.Tam, L.C.Goldstein, L.Strong, C.C.Kuo, L.Corey,
W.E.Stamm, H.H.Handsfield, J.S.Knapp und K.K.Holmes
Monoclonal Antibodies for Diagnosis of Infectious Diseases in Humans
Science 219, 637 (1983)
- C 1 A.Oka, N.Nomura, M.Morita, H.Sugisaki, K.Sugimoto und M.Takanami
Nucleotide Sequence of Small Cole1 Derivatives:
Structure of the Regions Essential for Autonomous Replication and
Cole1 Immunity
Mol.Gen.Genet. 172, 151 (1979)
- P 1 P.Phillipsen, R.A.Kramer und R.W.Davis
Cloning of the Yeast Ribosomal DNA Repeat Unit in Sst I and Hind III
Lambda Vectors Using Genetic and Physical Size Selection
J.Mol.Biol. 123, 371 (1978)
- P 2 A.Piekarowicz und S.W.Glover
Host Specificity of DNA in *Haemophilus influenzae*:
The Two Restriction and Modification Systems in Strain Ra
Mol.Gen.Genet. 116, 11 (1972)
- P 3 A.Piekarowicz, L.Kauc und S.W.Glover
Host Specificity of DNA in *Haemophilus influenzae*:
The Restriction and Modification Systems in Strains Rb and Pf
J.Gen.Microbiol. 81, 391 (1974)
- P 4 A.Piekarowicz und J.Kalinowska
Host Specificity of DNA in *Haemophilus influenzae*:
Similarity between Host Specificity Types of *Haemophilus influenzae*
Fe and Rf
J.Gen.Microbiol. 81, 405 (1974)
- R 1 V.B.Reddy, B.Thimmapaya, R.Dhar, K.N.Subramanian, B.S.Zain, J.Pan,
P.K.Grosh, M.L.Celma und S.M.Weissman
The Genome of Simian Virus 40
Science 200, 494 (1978)
- R 2 R.J.Roberts
Restriction Endonucleases
CPD Crit.Rev.Biochem. 4, 123 (1976)

- I R.J.Roberts
Restriction and Modification Enzymes and Their Recognition Sequences
Nucl.Acids Res. 11, r13¹ (1983)
- II 4 L.H.Robinson und A.Landy
Hind II, Hind III and Hpa I Restriction Fragment Maps of Bacteriophage
λ DNA
Gene 2, 1 (1977)
- R 5 G.Roizès, M.Patillon und A.Kovoor
A Restriction Endonuclease from *Agrobacterium tumefaciens*
FEBS Letters 82, 69 (1977)
- R 6 G.Roizès, M.Pages, C.Lecou, M.Patillon und A.Kovoor
A New Site-Specific Endonuclease Showing Phenotypical Crypticity in a
Tumorigenic Strain of *Agrobacterium tumefaciens*
Gene 6, 43 (1979)
- R 7 A.Rösch, K.Winkler und U.Sievert
Genome Rearrangement of the Rhizobiaceae:
Restriction and Modification
Abstracts of Papers Presented at the 38th Meeting of the Deutsche
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen, 5.-8.10.1981
Zbl.Bakt.Hyg. I, Abt.Orig. C 3, 557 (1982)
- R 8 E.B.Roslycky, O.N.Allen und E.McCoy
Phages for *Agrobacterium radiobacter* with Reference to Host Range
Can.J.Microbiol. 8, 71 (1962)
- II 9 D.Roulland-Dussoix und H.W.Boyer
The *Escherichia coli* B Pestriction Endonuclease
Biochem.Biophys.Acta 195, 219 (1969)
- P10 E.Niger, R.Springer und B.Jäckel
Genome Rearrangement of the Rhizobiaceae:
Demonstration of nif Genes and IS Elements
Abstracts of Papers Presented at the 38th Meeting of the Deutsche
Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Göttingen, 5.-8.10.1981
Zbl.Bakt.Hyg. I, Abt.Orig. C 3, 558 (1982)
- S 1 G.Sagner
Charakterisierung der Klasse II (Pro Wildtyp und Wildtyp) des Schemas
der Genomstrukturierung der Rhizobiaceae
Diplomarbeit, Universität Erlangen (1983)
- S 2 B.Sain und N.E.Murray
The hsd (Host Specificity) Genes of *Escherichia coli* K12
Mol.Gen.Genet. 180, 35 (1980)
- S 3 M.E.Sanders und T.R.Klaenhammer
Evidence for Plasmid Linkage of Restriction and Modification in
Streptococcus cremoris FH
Appl.Environmental Microbiol. 42, 944 (1981)
- S 4 F.Sanger und A.R.Coulson
A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis
with DNA Polymerase
J.Mol.Biol. 94, 441 (1975)

- S 5 F.Sanger, A.R.Coulson, T.Friedman, G.M.Air, B.G.Barrell, N.L.Brown, J.C.Fiddes, C.A.Hutchison III, P.M.Slocombe und M.Smith:
The Nucleotide Sequence of Bacteriophage ØX174
J.Mol.Biol. 125, 225 (1978)
- S 6 F.Sanger, A.R.Coulson, G.F.Hong, D.F.Hill und C.P.Petersen
Nucleotide Sequence of Bacteriophage λ
J.Mol.Biol. 162, 729 (1982)
- S 7 F.Schöffl
Molekularbiologische Charakterisierung von Resistenzfaktoren aus
klinisch isolierten, multiresistenten E.coli-Stämmen
Dissertation, Universität Erlangen (1975)
- S 8 D.Sciaky und R.J.Roberts, unveröffentlichte Ergebnisse
- S 9 R.K.Scopes
Protein Purification
Principles and Practice
in: Springer Advanced Texts in Chemistry,
Springer-Verlag, New York, Berlin und Heidelberg (1982)
- S10 P.A.Sharp, B.Sugden und J.Sambrook
Detection of Two Restriction Endonuclease Activities in Haemophilus
parainfluenzae Using Analytical Agarose-Ethidiumbromide Electrophoresis
Biochemistry 12, 3055 (1973)
- S11 U.Sievert
Aufklärung der spezifischen Erkennungssequenz des Restriktionsenzyms
Rlu-1 I aus Rhizobium lupini
Diplomarbeit, Universität Erlangen (1981)
- S12 M.Silverman, J.Zieg, M.Hilmen und M.Simon
Phase Variation in Salmonella:
Genetic Analysis of a Recombinational Switch
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 76, 391 (1979)
- S13 M.Simon, J.Zieg, M.Silverman, G.Mandel und R.Doolittle
Phase Variation: Evolution of a Controlling Element
Science 209, 1370 (1980)
- S14 H.O.Smith
Nucleotide Sequence Specificity of Restriction Endonucleases
Science 205, 455 (1979)
- S15 H.O.Smith und K.W.Wilcox
A Restriction Enzyme from Haemophilus influenzae:
I. Purification and General Properties
J.Mol.Biol. 51, 379 (1970)
- S16 H.O.Smith und D.Nathans
A Suggested Nomenclature for Bacterial Host Modification and
Restriction Systems and Their Enzymes
J.Mol.Biol. 81, 419 (1973)
- S17 J.D.Smith, W.Arber und U.Kühnlein
Host Specificity of DNA Produced by Escherichia coli
XIV. The Role of Nucleotide Methylation in in vitro B-Specific
Modification
J.Mol.Biol. 63, 1 (1972)

- S18 M.Spitzbarth, A.Pühler und W.Heumann
Characterization of Plasmids Isolated from *Rhizobium meliloti*:
Arch.Microbiol. 121, 1 (1979)
- S19 P.Staniewski
Typing of *Rhizobium* by Phages
Can J.Microbiol. 16, 1003 (1970)
- S20 P.Starlinger und H.Saedler
IS Elements in Microorganisms
Curr.Top.Microbiol.Immun. 75, 111 (1976)
- S21 T.Stonier, J.McSharry und T.Speitel
Agrobacterium tumefaciens Conn
IV. Bacteriophage PB2, and Its Inhibitory Effect on Tumor Induction
J.Virol. 1, 268 (1967)
- S22 J.S.Sussenbach, C.H.Monfoort, R.Schiphof und E.E.Stobberingh
A Restriction Endonuclease from *Staphylococcus aureus*
Nucl.Acids Res. 3, 3193 (1976)
- S23 J.G.Sutcliffe
Complete Nucleotide Sequence of the *Escherichia coli* Plasmid pBR322
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 43, 77 (1978)
- S24 E.Szomolanyi, A.Kiss und P.Venetianer
Cloning of the Modification Methylase Gene of *Bacillus sphaericus* P
in *Escherichia coli*
Gene 10, 219 (1980)
- S25 E.H.Szybalski und W.Szybalski
Gene 7, 217 (1979)
- T 1 R.Tausch
Zum Stoffwechsel und zur Taxonomie rot pigmentierter rethylotropher
Bakterien
Diplomarbeit, Universität Bayreuth (1981)
- T 2 M.Thomas, J.R.Cameron und R.W.Davis
Viable Molecular Hybrids of Bacteriophage Lambda and Eukaryotic DNA
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 71, 4579 (1974)
- T 3 E.Traeg
Charakterisierung von Phagen aus dem *Rhizobium-Agrobacterium*-Schema
Diplomarbeit, Universität Erlangen (1982)
- U 1 T.Uozumi, T.Hoshino, K.Miwa, S.Horinouchi, T.Beppo und K.Arino
Restriction and Modification in *Bacillus* Species
Genetic Transformation of Bacteria with DNA from Different Species
Part I
Mol.Gen.Genet. 152, 65 (1977)
- V 1 N.Van Larebeke, C.Genetello, J.P.Hernalsteens, A.Depicker, I.Zaenen,
E.Messens, M.Van Montagu und J.Schell
Transfer of Ti-Plasmids between *Agrobacterium* Strains by Mobilization
with the Conjugative Plasmid *EP4*
Mol.Gen.Genet. 152, 119 (1977)

- V 2 A. Van Pei und C. Colson
DNA Restriction and Modification Systems in Salmonella:
11. Genetic Complementation between the F and D Systems of *Escherichia coli* and the *Salmonella typhimurium* System SP with the Same Chromosomal Location
Mol. Gen. Genet. 135, 51 (1974)
- V 3 P.M.G.F. Van Wezenbeek, T.J.M. Van Hulsebos und J.J.G. Schoenmakers
Nucleotide Sequence of the Filamentous Bacteriophage M13 DNA Genome: Comparison with Phage fd
Gene 11, 129 (1980)
- V 4 L.P. Visentin, R.J. Watson, S. Martin und M. Zuker
unveröffentlichte Ergebnisse
- W 1 R.Y. Walder, J.L. Hartley, J.E. Donelson und J.A. Walder
Cloning and Expression of the Pst I Restriction-Modification System in *E. coli*
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1503 (1981)
- W 2 G.A. Wilson und F.E. Young
Isolation of a Sequence-Specific Endonuclease (Bam H) from *Bacillus amyloliquefaciens*
J. Mol. Biol. 97, 123 (1975)
- W 3 K.P. Winkler
Isolierung und Charakterisierung einer sequenzspezifischen Restriktionsendonuklease aus *Rhizobium lupini*
Diplomarbeit, Universität Erlangen (1979)
- Y 1 O.J. Yoo und K.L. Agarwal
Isolation and Characterization of Two Proteins Possessing Hpa II Methylase Activity
J. Biol. Chem. 255, 6445 (1980)
- Y 2 R. Yoshimori, D. Roulland-Dussoix und H.W. Boyer
P Factor-Controlled Restriction and Modification of Deoxyribonucleic Acid: Restriction Mutants
J. Bact. 112, 1275 (1972)
- Y 3 R. Yuan
Structure and Mechanism of Multifunctional Restriction Endonucleases
Ann. Rev. Biochem. 50, 285 (1981)
- Z 1 M. Zabeau und R.J. Roberts
The Role of Restriction Endonucleases in Molecular Genetics
in: *Molecular Genetics, Part III*
Academic Press Inc., New York (1979)

ANHANG III : Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Im folgenden wurden nur Abkürzungen aufgeführt, die nicht im vorhergehenden Text erklärt wurden bzw. nicht allgemein üblichen Abkürzungen entsprechen. Der angloamerikanischen Fachliteratur entlehene Abkürzungen wurden durch Anhängen von "(engl.)" gekennzeichnet.

Abb.	Abbildung
A.tumefaciens	Agrobacterium tumefaciens
B.amyloliquefaciens	Bacillus amyloliquefaciens
B.circulans	Bacillus circulans
B.globigii	Bacillus globigii
B.subtilis	Bacillus subtilis
Car-Typ r	Roter Carotinoid-Typ
Car-Typ y (Car-Typ g)	Gelber Carotinoid-Typ
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
e.o.p. (engl.)	Effektivität des Plattierens
H.influenzae	Haemophilus influenzae
KPO ₄	Äquimolares Gemisch aus K ₂ HPO ₄ und KH ₂ PO ₄
λ -dil-Puffer	Lambda-Phagen-Verdünnungspuffer
Md	Megadalton
Min-Typ	Minimal-Typ
m.o.i. (engl.)	Multiplizität der Infektion
Nif-Typ	Freilebend Stickstoff-fixierender Typ
OD	Optische Dichte
OD ₂₆₀ (280, 560)	Optische Dichte bei 260 (280, 560) nm
P.aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
PC-Puffer	Phosphocellulose-Säulen-Puffer
pers.Mitteilung	persönliche Mitteilung
P.stuartii	Providencia stuartii
R.leguminosarum	Rhizobium leguminosarum
R.lupini	Rhizobium lupini
R.meliloti	Rhizobium meliloti
R.phaseoli	Rhizobium phaseoli
R.species	Rhizobium species
R.trifolii	Rhizobium trifolii
rpm (engl.)	Umdrehungen pro Minute
S.albus	Streptomyces albus
S.aureus	Staphylococcus aureus
S.marcescens	Serratia marcescens
S.potsdam	Salmonella potsdam
S.typhimurium	Salmonella typhimurium
StrSO ₄	Streptomycinsulfat
Tab.	Tabelle
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEM-Puffer	Tris-EDTA-MgCl ₂ -Merkaptoäthanol-Puffer
TM-Puffer	Tris-Merkaptoäthanol-Puffer
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
w/v (engl.)	Gewichtsprozent
X.badrii	Xanthomonas badrii
X.holcicola	Xanthomonas holcicola
X.malvacearum	Xanthomonas malvacearum

Mein großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Heumann für die Überlassung des Themas und sein reges Interesse am Fortschreiten dieser Dissertation. Speziell bedanken möchte ich mich außerdem bei Herrn Dr. Rösch für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit und seine stetige Unterstützung, auch im privaten Bereich. Einen besonderen Dank möchte ich auch an meine Freunde und Kollegen aus den Labors, der Nährbodenküche, der Werkstatt und an Frau Hofmann aus dem Sekretariat richten, deren menschliche Beziehung zu mir und dieser Arbeit unvergessen bleiben wird. Ein großes Dankeschön gebührt darüberhinaus meiner Schwägerin, Frau Helga Tischer, für das hervorragende Tippen der Arbeit und Herrn Kokotek für die sehr gute photographische Arbeit. Mein allerletzter Dank gehört jedoch meiner Frau für ihre Geduld und dafür, daß sie an mich glaubte und mir stets Rückhalt war und ist.

TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Persönliche Daten:	Name:	Klaus-Peter Hans Winkler
	Beruf:	Biologe
	geboren:	18.5.1951 in Hohenberg/Eger
	Nationalität:	deutsch
	Familienstand:	verheiratet, 3 Kinder
Werdegang:	1957 - 1962	Volksschule Laaber b.Regensburg
	1962 - 1971	Gymnasium Regensburg und München
	19. 6.1971	Bestehen der Reifeprüfung am Luitpold-Gymnasium München
	Oktober 1971	Beginn des Biologiestudiums an der Universität Erlangen
	26. 5.1975	Bestehen der Diplom-Vorprüfung
	9. 6.1978	Bestehen der mündlichen Diplom- Hauptprüfung
	November 1978	Beginn der Diplomarbeit
	7. 1.1980	Verleihung des akademischen Gra- des eines Diplom-Biologen
	März 1980	Beginn der Doktorarbeit
	15. 3.1980	Verwalter einer vakanten wissen- schaftlichen Assistentenstelle
	- 31. 7.1981	am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Biochemie
	15. 4.1982	Wissenschaftlicher Assistent
	- 31.12.1982	am Lehrstuhl für Mikrobiologie und Biochemie
	seit 21.11.1983	Biologielehrer am Berufskolleg für Biologisch-Technische Assi- stenten in Überlingen/Bodensee

